



*Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra*

Engenharia Biomédica

*Desenvolvimento de Adesivos Biológicos
Biodegradáveis*

Ana Luísa de Castro Pacheco da Cunha

Coimbra, Setembro de 2008

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Helena Gil (Universidade de Coimbra).

Ana Luísa de Castro Pacheco da Cunha

Setembro de 2008

Agradecimientos

Começo por agradecer à Professora Doutora Helena Gil por ter acarinhado a realização deste projecto e recebido de bom grado a minha candidatura. As achegas ao longo da orientação deste trabalho foram imprescindíveis para o seu desenvolvimento e também para a minha valorização profissional. Não posso deixar de referir a sua grande disponibilidade no acompanhamento do trabalho, a simpatia com que sempre me recebeu e ainda o grande exemplo de profissionalismo e competência que desde logo pude tomar como exemplo.

Em segundo lugar queria deixar um sincero agradecimento à Doutora Paula Ferreira pela permanente disponibilidade e apoio, pela ajuda em alturas mais difíceis, pelos conhecimentos que me transmitiu e pelas palavras sempre amigas que me dirigiu.

A todos os elementos do grupo de polímeros, pela forma como me receberam e pelas preciosas ajudas que me facultaram.

Ao Professor Doutor Amílcar Ramalho, do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra, por ter posto ao dispor os equipamentos de laboratório a seu cargo, essenciais na fase inicial deste projecto experimental.

Não poderia deixar de agradecer de uma forma muito especial à Professora Doutora Ana Cristina Santos, investigadora do IBILI, pela constante ajuda ao longo de todo o trabalho dos testes de adesão celular, pelo imenso tempo dispensado, pela disponibilidade e apoio prestados, quer na análise de resultados, quer na colaboração desta dissertação.

Deixo também uma palavra de apreço ao Doutor Alexandre Pires, do Centro de Neurociências de Coimbra (CNC), responsável pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), pela cedência dos ratos utilizados nos ensaios. Agradeço ainda às colegas Cláudia, Rita e Sandra pela enorme simpatia, pelos pontuais ensinamentos e pela ajuda na análise dos resultados.

Queria também agradecer de uma forma muito especial a todos os meus amigos pelos constantes apoios, momentos de descontração e diversão bem passados, úteis para recuperar energias. Finalmente aos meus pais, irmão, namorado, Bianca e restante família, por me ajudarem a ultrapassar todos os obstáculos encontrados, por todo o apoio, carinho, incentivo e compreensão demonstrados.

Resumo

A ideia de desenvolver um adesivo biológico capaz de dar resposta no encerramento de incisões, já há muito tem vindo a ser explorada. O estudo deste novo material tem constituído uma grande aposta, por reflectir uma significativa melhoria da qualidade de vida humana.

Este método constitui uma alternativa às diversas técnicas já existentes para a cicatrização de feridas, como a suturação, a aplicação de fitas cirúrgicas ou a utilização de agrafos. Entre as diversas potencialidades que apresenta, podemos referir a sua absorção pelo organismo, a elevada biocompatibilidade, a facilidade de aplicação, a capacidade regenerativa e não existir necessidade da sua remoção.

O objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um polímero tendo por base o polissacarídeo da agarose, para aplicação como adesivo biológico. Sintetizaram-se pré-polímeros que continham ligações uretana, fazendo reagir os grupos hidroxílicos da agarose com o metacrilato de 2-isocianoetilo, introduzindo assim ligações duplas C=C na sua estrutura. Desenvolveram-se compostos passíveis de serem reticulados fotoquimicamente (radiação U.V.) pela elevada taxa de cura que apresentam. Após a síntese, procedeu-se à adição do agente fotoiniciador Irgacure 2959[®] (Ir2959), por este ser bem tolerado por um vasto conjunto de células. Formaram-se várias membranas com diferentes percentagens de modificação da agarose (50% e 75%), e com diferentes concentrações de Ir2959 (8%, 10%, 12% e 15%).

Depois da preparação das membranas procedeu-se à sua caracterização através de diversas técnicas, que incluíram: análise de espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada, determinação da capacidade de absorção de água, determinação das energias de superfície por medição dos ângulos de contacto e avaliação da capacidade de adesão em substratos aminados.

Finalmente, realizaram-se testes de adesão celular, através do estudo da citotoxicidade *in vitro* para fibroblastos de rato. O método usado foi o teste colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio).

Após a realização destes testes, concluiu-se que, no que concerne à capacidade de absorção de água, os melhores resultados surgiram para as membranas com modificação de 50% e adição de 8% de Ir2959; para os testes de adesão e biológicos, os melhores resultados surgiram para as membranas com 75% de modificação e adição de 15% de Ir2959.

Lista de abreviaturas

ATR – Reflexão total atenuada

ATR-FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier com reflexão total atenuada

DMEM – *MegaCell Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

FDA – *Food and Drug Administration*

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

HIV – *Human immunodeficiency virus*

IBB – Instituto de Biofísica e Matemática

IBILI – Instituto Biomédico de Investigação da Luz e da Imagem

MIE – Metacrilato de 2-isocianoetilo

Ir2959 – Irgacure 2959[®]

ISO – *International Organization Standardization*

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

IV – Infravermelho

MTT – Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio

NCO – Grupo isocianato

OH – Grupo álcool

PU – Poliuretana

SF – Segmento flexível

SR – Segmento rígido

UV – Ultravioleta

rpm – Rotações por minuto

Nomenclatura

A	Absorvância
θ	Ângulo de contacto
σ_l^d	Componente dispersiva do líquido
σ_s^d	Componente dispersiva do sólido
σ_l^p	Componente polar do líquido
σ_s^p	Componente polar do sólido
ΔP	Diferença de pressão entre lado côncavo e convexo
I	Intensidade da radiação incidente
I_0	Intensidade inicial da radiação incidente
W_h	Peso hidratado
W_s	Peso seco
R	Raio de curvatura da gota
T_g	Temperatura de transição vítrea
σ_s	Tensão superficial do sólido
σ_l	Tensão superficial líquido-líquido
σ_{sl}	Tensão superficial sólido-líquido
T	Transmitância

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	VII
Lista de abreviaturas.....	X
Nomenclatura.....	XV
Índice.....	XIX
Índice de figuras.....	XXV
Índice de quadros.....	XXIX
Índice de tabelas.....	XXXIII
Capítulo I.....	1
1. Introdução.....	1
1.1. Biomateriais e Biocompatibilidade.....	3
1.2. Polímeros.....	5
1.2.1. Polimerização.....	6
1.2.2. Fotopolimerização.....	7
1.3. Técnicas utilizadas no encerramento de feridas incisas.....	9
1.3.1. Suturas.....	9
1.3.2. Fitas adesivas cirúrgicas.....	10
1.3.3. Agrafos.....	11
1.3.4. Adesivos cirúrgicos.....	12
1.3.4.1. Cianoacrilatos.....	14
1.3.4.2. Fibrina.....	15
1.3.4.3. Gelatina-resorcinol-formaldeído.....	15
1.3.4.4. Albumina.....	16
1.3.4.5. Poliuretanas.....	16
1.3.4.5.1. Aplicações biomédicas das poliuretanas.....	19

1.4. Agarose.....	20
1.5. Citocompatibilidade.....	22
1.5.1. Tecido conjuntivo e fibroblastos.....	22
1.5.2. Teste do MTT.....	26
1.6. Referências bibliográficas ¹	26
Capítulo II.....	31
2. Processos de caracterização.....	31
2.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)...	33
2.2. Avaliação da capacidade de absorção de água (<i>Swelling</i>).....	35
2.3. Testes de adesão em gelatina.....	37
2.4. Determinação da tensão superficial e da energia de superfície por medição dos ângulos de contacto.....	38
2.5. Referências bibliográficas ¹	41
Capítulo III.....	45
3. Materiais e métodos.....	45
3.1. Reagentes.....	47
3.2. Síntese do pré-polímero.....	48
3.3. Reticulação fotoquímica.....	50
3.4. Procedimentos dos processos de caracterização.....	51
3.4.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (FTIR- ATR).....	51
3.4.2. Avaliação da capacidade de absorção de água (<i>Swelling</i>).....	52
3.4.3. Testes de adesão em folhetos de gelatina.....	53
3.4.4. Determinação da tensão superficial e da energia de superfície por medição dos ângulos de contacto.....	55

3.4.5. Testes de adesão celular.....	56
3.4.5.1. Realização dos testes de adesão celular.....	60
3.5. Referências bibliográficas ¹	64
Capítulo IV.....	65
4. Resultados e discussão.....	65
4.1. Tempo de irradiação.....	67
4.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR).....	70
4.3. Avaliação da capacidade de absorção de água (<i>Swelling</i>).....	74
4.4. Testes de adesão em gelatina.....	78
4.5. Determinação da tensão superficial e da energia de superfície por medição dos ângulos de contacto.....	79
4.6. Testes de adesão celular.....	81
4.7. Referências bibliográficas ¹	87
Capítulo V.....	89
5. Conclusão.....	89

¹ Referências bibliográficas elaboradas segundo as regras de Harvard.

Índice de figuras

Figura 1.1: Esquema da polimerização fotoquímica [10].

Figura 1.2: Fita suturante usada no tratamento de incisões [16].

Figura 1.3: Aplicação de agrafos no encerramento de feridas [20].

Figura 1.4: Unidade estrutural de um cianoacrilato.

Figura 1.5: Representação do grupo uretana [29].

Figura 1.6: Representação dos grupos químicos éster e amida [31].

Figura 1.7: Reacção de síntese de uma poliuretana a partir de um diisocianato e de um diol [34].

Figura 1.8: Exemplos de algas vermelhas [43].

Figura 1.9: Classificação dos diferentes tipos de tecido conjuntivo [49].

Figura 2.1: Regiões de absorção da radiação infravermelha em polímeros [3].

Figura 2.2: Esquematização do funcionamento do ATR-FTIR [7].

Figura 2.3: Esquema representativo dos folhetos de gelatina com a amostra.

Figura 2.4: Esquema representativo de um ângulo de contacto estabelecido entre uma gota de líquido e uma superfície sólida [15].

Figura 3.1: Estrutura química do metacrilato de 2-isocianoetilo (MIE) [1].

Figura 3.2: Estrutura química da agarose [2].

Figura 3.3: Estrutura do Irgacure[®] 2959 (Irg2959) [6].

Figura 3.4: Lâmpada Ultravioleta *UVGL-48, Multiband U.V., da Mineral light[®] lamp.*

Figura 3.5: Equipamento de ATR-FTIR *Magma-IRTM Spectrometer 750.*

Figura 3.6: Máquina universal de ensaios mecânicos *ChatillonTM TCD-1000.*

Figura 3.7: Esquema representativo de uma amostra durante um ensaio de tracção.

Figura 3.8: Equipamento para medição de ângulos de contacto *OCA 20 – DataPhysics.*

Figura 3.9: Aparelho de esterilização U.V. no interior da câmara de fluxo laminar.

Figura 3.10: Aparelho de microELISA (*SLT Spectra*).

Figura 4.1: Esquema da modificação da agarose com MIE (a) e subsequente irradiação U.V. na presença do Ir2959 (b) originando matrizes reticuladas.

Figura 4.2: Espectros da análise ATR-FTIR para agarose, MIE e agarose modificada (agarose-MIE) (75% de modificação da molécula).

Figura 4.3: Espectro de ATR-FTIR da membrana 75%-15%.

Figura 4.4: Valores da média de *swelling* para 8% de adição de Ir2959.

Figura 4.5: Valores da média de *swelling* para 10% de adição de Ir2959.

Figura 4.6: Valores da média de *swelling* para 12% de adição de Ir2959.

Figura 4.7: Valores da média de *swelling* para 15% de adição de Ir2959.

Figura 4.8: Valores de força máximos registados para cada amostra.

Figura 4.9: Fotografia digital de fibroblastos de rato com as membranas para 24h – a) imagem para membrana nº 2¹ (200 ×) e b) imagem para membrana nº 6 (100 ×).

Figura 4.10: Fotografia digital de fibroblastos de rato com membranas para 96h – a) imagem para membrana nº 2 (200 ×) e b) imagem para membrana nº 6 (400 ×).

Figura 4.11: Fotografia digital de fibroblastos de rato com a membrana nº 2 – a) imagem para 24h (100 ×), b) imagem para 72h (100 ×), c) imagem para 110h (100 ×).

Figura 4.12: Fotografia digital de fibroblastos de rato com a membrana nº 5 – a) imagem para 24h (200 ×), b) imagem para 72h (100 ×), c) imagem para 110h (100 ×).

Figura 4.13: Fotografia digital de fibroblastos de rato com a membrana nº 6 – a) imagem para 24h (100 ×), b) imagem para 72h (100 ×), c) imagem para 110h (200 ×).

Figura 4.14: Fotografia digital de fibroblastos de rato após adição do MTT – a) imagem da membrana nº 5 (200 ×), b) imagem da membrana nº 6 (100 ×).

Índice de quadros

Quadro 1.1: Aplicações clínicas e características dos vários tipos de biomateriais [2].

Quadro 1.2: Representação das várias áreas de aplicação das PU [38].

Quadro 1.3: Sub-tipos do tecido conjuntivo.

Quadro 3.1: Lista dos reagentes utilizados.

Quadro 3.2: Esquema representativo da disposição das membranas na caixa de 48 poços.

Quadro 3.3: Esquema representativo da disposição das membranas na caixa de 96 poços.

Índice de tabelas

Tabela 4.1: Tempos de fotopolimerização mínimos para as várias amostras preparadas.

Tabela 4.2: Valores de energia de superfície e as respectivas componentes dispersivas e polares.

Tabela 4.3: Valores médios de viabilidade celular (absorvância) para cada membrana.

Capítulo I

Introdução

A necessidade de melhores diagnósticos e tratamentos médicos geram um interesse crescente no desenvolvimento e caracterização de materiais que podem ser utilizados para medir, restaurar e melhorar a função fisiológica e a qualidade de vida dos pacientes.

Os adesivos biológicos são actualmente objecto de estudo, surgindo como uma possível alternativa no encerramento de feridas, devido às inúmeras vantagens que têm apresentado.

Este projecto consistiu no desenvolvimento de um adesivo feito à base de um polímero natural, a ser reabsorvido pelo organismo humano. Desta forma, degradar-se-ia em produtos biocompatíveis, promovendo a regeneração dos tecidos.

1.1. Biomateriais e Biocompatibilidade

Um biomaterial é definido como sendo um produto farmacologicamente inerte, usado para integrar sistemas vivos e que irá interagir com os sistemas e fluidos biológicos. Pela definição clássica de biomaterial, este é “ parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” [1]. Contudo não podemos falar de biomateriais sem falar de biocompatibilidade.

A biocompatibilidade reflecte a interacção que o material tem com o organismo biológico.

Os biomateriais devem assim apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada aos mesmos. No entanto, na maior parte das vezes, antes de se efectuar um implante de um biomaterial é necessário efectuar modificações ao nível da sua superfície para evitar reacções de rejeição. A biocompatibilidade pressupõe uma compatibilidade mecânica entre o material e o tecido, e uma boa interacção na interface do material com as células ou tecidos.

Das categorias de materiais que são usados como biomateriais, podemos referir: os metais, os cerâmicos, as biomoléculas naturais modificadas, os polímeros sintéticos e os materiais compósitos.

No Quadro 1.1 apresentam-se, de uma forma muito resumida, as vantagens e desvantagens da sua utilização, bem como as suas aplicações clínicas.

Quadro 1.1: Aplicações clínicas e características dos vários tipos de biomateriais [2].

	Exemplos	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Metais	Ligas de cromo-cobalto, ligas de titânio-níquel, aço inoxidável.	Elevada resistência ao desgaste mesmo a temperaturas elevadas, alta força de tensão, dúcteis à temperatura ambiente.	Facilmente corrosíveis, baixa biocompatibilidade.	Aplicações ortopédicas, implantes dentários.
Cerâmicos	Sílicas, óxidos metálicos, carbonetos, fosfatos de cálcio, alumina.	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta força compressiva, bioinertes.	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade.	Aplicações dentárias, válvulas, tendões, tubos de ventilação, sistemas de libertação controlada.
Compósitos	Fibras de carbono, resinas, fibras de vidro.	Boa compatibilidade, dotados de rigidez, resistentes à corrosão, inertes, estrutura porosa.	Baixa resistência mecânica.	Válvulas cardíacas, auxílio em implantes de joelhos.
Polímeros	Polietileno, Poli(cloreto de vinilo), Poliéster, Poliuretanas, Poli (metacrilato de metilo), Silicone.	Elevada biocompatibilidade, facilidade no fabrico, grande elasticidade.	Possibilidade de degradação, baixa resistência mecânica.	Suturas, aplicações oftalmológicas, implantes, engenharia de tecidos, próteses.

A grande maioria dos biomateriais utilizados actualmente são os polímeros, pois podem ser manipulados de forma a corresponder à sua aplicação final.

1.2. Polímeros

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) um polímero é definido como sendo uma substância composta por várias moléculas, caracterizada por uma repetição múltipla de uma ou mais espécies de átomos ou grupos de átomos. Estas unidades estão ligadas quimicamente entre si de modo a formar um material de peso molecular elevado. Os polímeros são sintetizados a partir de moléculas mais simples, os monómeros, por um processo denominado de polimerização [3], [4].

Os materiais poliméricos podem classificar-se do seguinte modo.

- **Quanto à sua natureza:** podendo ser naturais ou sintéticos. Enquanto que os polímeros naturais existem na natureza, os sintéticos são obtidos a partir de monómeros por polimerização.

- **Quanto à forma molecular:** podem ser classificados como lineares, ramificados ou reticulados. Os lineares apresentam ligações de monómeros uns ao lado dos outros em posição fixa; os ramificados apresentam pelo menos um monómero completo ligado à cadeia principal; os reticulados apresentam uma estrutura na qual as cadeias poliméricas estão ligadas entre si através de ligações covalentes², podendo ser lineares ou ramificadas, formando assim uma rede.

- **Quanto ao tipo de monómeros:** se os polímeros forem preparados a partir de um único monómero denominam-se homopolímeros, caso sejam preparados a partir de dois ou mais monómeros classificam-se de copolímeros. Estes últimos podem ainda ser classificados relativamente à disposição dos vários monómeros ao longo da cadeia em copolímero aleatório, copolímero em bloco, copolímero alternado e copolímero enxertado.

² Ligação covalente – ligação na qual dois electrões são partilhados entre dois átomos. É a ligação que mais força tem [5].

- **Quanto ao comportamento térmico:** nesta categoria, os polímeros podem ser classificados em termoplásticos (que podem ser moldados por acção da temperatura) e termorrígidos (uma vez modificados devido à acção da temperatura, não retomam o seu estado inicial).

- **Quanto ao comportamento mecânico:** são classificados em três classes principais: os plásticos, as fibras ou os elastómeros. Os plásticos podem sofrer deformação sob acção do calor e pressão; as fibras são materiais de grandes dimensões compostas por macromoléculas lineares orientadas longitudinalmente. Os elastómeros são materiais dotados de grande elasticidade.

- **Quanto à cristalinidade:** podem ser divididos entre cristalinos, semi-cristalinos e amorfos. Os polímeros cristalinos caracterizam-se por conterem arranjos moleculares ordenados ou direccionados, sendo opacos; os polímeros amorfos caracterizam-se por arranjos moleculares desordenados, os semi-cristalinos apresentam simultaneamente na sua estrutura estados ordenados e estados desordenados.

1.2.1 Polimerização

Existem dois tipos básicos de polimerização: a polimerização por adição e a polimerização por reacção gradual.

No primeiro caso, o monómero apresenta uma ligação dupla que será quebrada com a adição de outros monómeros. A quebra da ligação dupla inicia a polimerização e pode ocorrer sob diversas formas (radicalar, aniónica, catiónica) e em diversos meios (massa, em suspensão, em emulsão).

Na polimerização por reacção gradual, ocorre uma reacção covalente entre dois monómeros bifuncionais, como é o caso das poliuretanas [6].

Os polímeros são biomateriais que podem ser manipulados de modo a corresponderem aos pré-requisitos exigidos para a sua futura aplicação. São várias as características que podem ser manipuladas, que vão desde a sua biodegradação, ao seu carácter hidrofílico ou

hidrofóbico, à sua maior ou menor resistência à ruptura, à solubilidade, entre muitos outros.

A aplicação de materiais poliméricos na área da medicina tem vindo a crescer ao longo dos últimos anos, com aplicações ao nível da engenharia de tecidos, da oftalmologia, medicina dentária, ortopedia, órgãos artificiais, etc.

Pelo facto de poderem ser mais facilmente alteráveis, através da manipulação das suas características, os polímeros sintéticos são os que mais aplicações têm nestas áreas. No entanto, tem-se assistido cada vez mais ao desenvolvimento de biomateriais de acordo com a sua finalidade e de acordo com as vantagens que estes apresentam. Neste campo os biomateriais à base de polímeros naturais apresentam características bastante vantajosas para a sua empregabilidade. De referir a existência de biocompatibilidade, a não ocorrência de reacções inflamatórias e alérgicas, e a sua degradação originar produtos não tóxicos e perfeitamente suportados pelo organismo humano.

Neste trabalho pretendeu-se que o polímero fosse reticulado através de irradiação ultravioleta (U.V.).

1.2.2 Fotopolimerização

A fotopolimerização induzida pela radiação U.V. a monómeros multifuncionais tem-se tornado uma tecnologia cada vez mais aceite e que tem servido para a produção de adesivos, selantes, sistemas de libertação controlada de fármacos e de produtos compósitos [7]. Os compostos fotopolimerizáveis possuem na sua estrutura grupos que têm a capacidade de absorver uma radiação que vai provocar o aparecimento de radicais. Teremos então monómeros activos ou pré-polímeros reactivos. Estes compostos contendo estas espécies vão polimerizar ou vão reticular, levando à formação de polímeros lineares ou reticulados [8].

Os polímeros quando preparados por fotopolimerização apresentam vantagens, tais como: alta taxa de cura à temperatura ambiente, possibilidade de ausência de solventes, boa adesão a vários substratos, elevada estabilidade durante o armazenamento, elasticidade controlada e um possível controlo da polimerização [9].

Para que se inicie a fotopolimerização é necessário adicionar um fotoiniciador. Os fotoiniciadores poliméricos podem ser definidos como sistemas de macromoléculas que são sensíveis à luz ultravioleta e com a absorção desta, transformam-se em radicais, iniciando o processo de polimerização [8].

Como se pode visualizar na Figura 1.1, quando as moléculas do fotoiniciador absorvem a luz ultravioleta ficam excitadas o que permite a formação de radicais livres. Estes, por sua vez, induzem reacções nas moléculas dos monómeros, terminando com a formação de uma matriz polimérica reticulada [7].

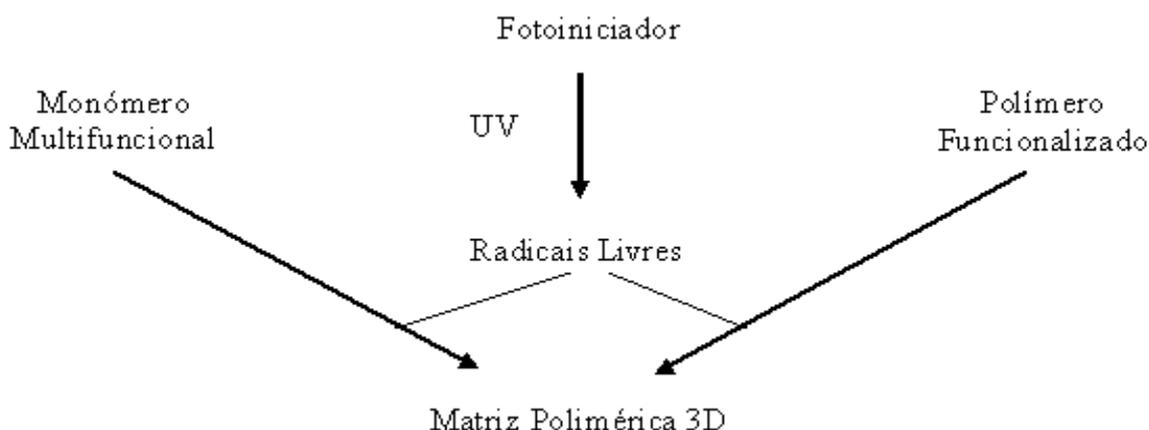


Figura 1.1: Esquema da polimerização fotoquímica [10].

O fotoiniciador tem assim um papel importante no controlo da taxa de formação da reacção, induzida pela luz U.V., e na penetração da radiação incidente na amostra. Para ser eficiente necessita de absorver o exacto comprimento de onda, emitido pela luz incidente [11].

As moléculas fotoiniciadoras podem dividir-se em dois tipos: Tipo I e Tipo II. As do Tipo I quando expostas à luz U.V. sofrem um processo de fragmentação e formação de radicais livres, tendo como exemplo destes compostos as acetofenonas. As do Tipo II são constituídas pelas benzofenonas, e pressupõe um processo primário de remoção de um átomo de hidrogénio [12].

Foram efectuados estudos no sentido de avaliar a compatibilidade biológica dos fotoiniciadores com 6 linhagens celulares distintas. Testaram-se assim três tipos diferentes de agentes fotoiniciadores: a 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure[®] 2959), a 1-hidroxiciclohexil-1-fenil cetona (Irgacure[®]184) e a 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (Irgacure[®] 651). Conclui-se assim, que o Ir2959 causa a menor toxicidade entre os vários fotoiniciadores testados.

Conclui-se também que este é bem tolerado pelas várias linhagens celulares testadas, e a várias concentrações químicas [13]. De acordo com estas conclusões optou-se pelo uso do Ir2959 ao longo deste trabalho experimental.

1.3. Técnicas utilizadas no encerramento de feridas incisais

Existem vários métodos usados para o tratamento de feridas incisais. Estes métodos têm como função a aposição das bordas do ferimento, facilitando a cicatrização e o consequente processo de restauração. Cada processo tem as suas vantagens e desvantagens, cabendo ao cirurgião a escolha do melhor método para fechar o ferimento em causa.

1.3.1 Suturas

O recurso às suturas usado no encerramento de feridas remonta aos tempos dos egípcios. É dos métodos mais praticados para suturar uma ferida, assegurando os dois lados dos tecidos unidos. Esta técnica requer material de suturas, instrumentos esterilizados, anestesia local, bem como assistentes durante o seu procedimento. Por outro lado é necessário efectuar a remoção dos pontos, após o processo de cicatrização estar completamente concluído [14].

Os fios de sutura podem ser classificados em várias categorias, tendo em conta a degradação feita pelo organismo (reabsorvíveis ou não reabsorvíveis), a sua origem (natural ou sintética) e quanto ao número de filamentos que as constituem (mono-filamentadas ou multi-filamentadas).

Uma sutura ideal deverá incluir as seguintes características:

- Elevada força de tensão;
- Baixa reacção por parte dos tecidos;
- Elasticidade;
- Esterilidade;
- Flexibilidade;
- Fácil manuseamento;
- Implicar baixos custos.

No entanto, até à data ainda não existe nenhum tipo de sutura que contenha todos estes atributos [15].

As suturas reabsorvíveis, para além de serem absorvidas pelo organismo, caracterizam-se por, em aproximadamente 60 dias, perderem grande parte da sua força mecânica. Por outro lado podem não ter a força necessária para sustentar os tecidos até que estes se encontrem devidamente cicatrizados. Este tipo de suturas pode ter origem sintética, como as de poli(ácido glicólico) e poli(ácido láctico), ou origem biológica, como as de *catgut*, sendo estas últimas formadas por colagénio reticulado com glutaraldeído.

As suturas não reabsorvíveis são as mais frequentemente utilizadas e caracterizam-se por não estarem sujeitas a degradação por parte do organismo humano. Também este tipo de suturas pode ter origem natural como as fibras de algodão, linho, seda, ou origem sintética como o nylon e o propileno.

A necessidade de aplicação de anestesia, a necessidade de remoção das suturas (no caso das não reabsorvíveis) e a permanência de uma cicatriz, sugerem uma procura de métodos alternativos.

1.3.2. Fitas adesivas cirúrgicas

A fita suturante é outra alternativa existente para aproximar os lados de um ferimento, desde que estes estejam relativamente próximos (Figura 1.2). São usadas no encerramento de pequenas feridas que necessitem de uma força de tensão baixa, pois nem sempre é fácil manter a adesão entre os tecidos. O seu uso é muito comum em cortes que não tenham mais que 1cm de profundidade.



Figura 1.2: Fita suturante usada no tratamento de incisões [16].

Apresenta como principais vantagens o conforto da sua aplicação, a prevenção de processos de necrose, baixas taxas de infecções e de reacções adversas do tecido. Constitui também uma aplicação rápida, diminuindo assim o tempo utilizado, os espaços ocupados nas salas de operações, e os custos dispendidos.

Apresentam a desvantagem de não poderem ser aplicadas em zonas molhadas ou húmidas, em zonas que estejam sujeitas a movimentos constantes e em zonas com elevada pilosidade. São também incapazes de aproximar tecidos profundos, pelo que a sua aplicação é mais superficial.

Estes materiais podem também servir como complemento das suturas ou adesivos biológicos [17], [18].

1.3.3. Agrafos

Este método também é útil no encerramento de feridas de grandes dimensões, possibilitando uma rápida aplicação relativamente aos restantes métodos (Figura 1.3). Está associado a baixas taxas de reacções adversas e de infecções por parte do organismo, apresentando-se como um método bastante económico.

Em casos mais graves poderá dar origem a cicatrizações ineficientes ou a cicatrizes permanentes, se a cicatrização não tiver sido feita de forma rigorosa e apropriada. Comparativamente com os adesivos ou as suturas, possuem uma fraca força de tensão, e não podem ser aplicados em todas as zonas do corpo, como por exemplo, na face ou na mão.

Mais recentemente começaram a desenvolver-se agrafos biodegradáveis, feitos à base de poli(ácido láctico-co-glicólico). Estes sofrem hidrólise e são lentamente absorvidos pelo

organismo. Actualmente existe um produto deste tipo no mercado, comercializado pela *Incisive Surgical Inc.*, denominado de *Inisorb*[®] [18], [19].



Figura 1.3: Aplicação de agrafos no encerramento de feridas [20].

1.3.4. Adesivos cirúrgicos

Os adesivos constituem uma alternativa viável aos restantes métodos no encerramento de feridas.

O avanço tecnológico tem permitido produzir e aumentar a oferta de adesivos e de colas biológicas de emprego cirúrgico generalizado.

Um adesivo cirúrgico pode ser definido como uma substância com características que, ao contactar com o organismo, possibilitem a polimerização. Este deverá manter os tecidos biológicos unidos ou servir como barreira a possíveis fugas de fluidos [21].

Os adesivos biológicos estão indicados para o fecho de pequenas incisões à superfície da pele, bem como em lacerações e traumas menores, em áreas que requerem baixa força de tensão. A sua utilização não está indicada na zona das articulações, tal como em joelhos ou cotovelos. Este deverá ter uma acção entre 7 a 10 dias.

A aplicação de um adesivo deve obedecer a três objectivos principais. O primeiro é promover a homeostase, promovendo a coagulação local. Muitos dos agentes que compõem o adesivo vão actuar em parceria com os eventos que ocorrem na cascata de

coagulação, e muitas das vezes, aumentar a homeostase do paciente. O segundo é permitir a adesão dos tecidos circundantes. O terceiro objectivo visa que os adesivos podem ainda funcionar como sistemas de libertação controlada, podendo incluir fármacos ou factores de crescimento [21].

Comparativamente com os restantes métodos, a utilização de adesivos possibilita uma rapidez na sua aplicação, rápida absorção, estabilidade à temperatura ambiente, um maior conforto por parte do paciente pois não causa dor, nem necessita de remoção [22]. Para além dos factores evidenciados, existe um risco diminuído de infecções, aliado aos baixos custos e a cirurgias mais eficazes. Como principais desvantagens verifica-se essencialmente a sua força de tensão, que é significativamente menor do que a das suturas.

No decorrer deste projecto, e para o desenvolvimento de um adesivo com futura aplicação médica, não pudemos deixar de considerar os aspectos físico-químicos, biológicos e mecânicos. Relativamente aos aspectos físico-químicos requer-se um endurecimento gradual do adesivo, alta adesão e coesão em ambientes caracterizados por hemorragias, variações pouco significativas no seu volume e uma elevada capacidade de deformação. No que concerne aos aspectos biológicos, o adesivo deverá estar esterilizado, ser de fácil uso, ser reabsorvido em produtos toleráveis pelo organismo, ter uma baixa toxicidade e uma alta biocompatibilidade. Finalmente as suas propriedades mecânicas deverão ser adaptadas a uma recuperação funcional rápida [23].

Para a concepção do adesivo biológico, ao longo deste trabalho, foram considerados diversos factores tais como [24]:

- ✓ O adesivo deve ser suficientemente resistente, a ponto de sustentar a cura da ferida e a regeneração dos tecidos;
- ✓ Tanto os seus componentes iniciais, como os seus produtos finais de degradação, não devem surtir qualquer efeito tóxico;
- ✓ Nem o adesivo, nem os seus produtos de degradação deverão produzir reacções alérgicas, inflamatórias, cancerígenas ou mutagénicas;
- ✓ A polimerização, que conduz a sua formação, deve ser rápida e o seu calor resultante não deverá provocar efeitos indesejados;
- ✓ O material deverá ser de fácil e rápida aplicação, favorecendo a homeostase do organismo.

Actualmente existem vários tipos de adesivos biológicos, já testados no campo clínico. Podemos referenciar os sintéticos, à base de cianoacrilatos ou de poliuretanas, e os naturais como a fibrina, a gelatina (reticulada com resorcinol-formaldeído), ou albumina.

1.3.4.1. Cianoacrilatos

O grupo dos cianoacrilatos caracteriza-se pela unidade estrutural representada na figura seguinte (Figura 1.4).

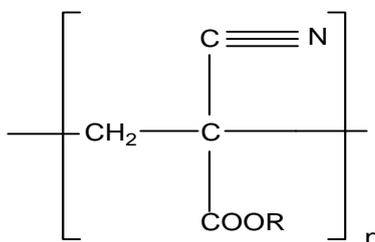


Figura 1.4: Unidade estrutural de um cianoacrilato.

Os adesivos à base de cianoacrilatos polimerizam numa reacção exotérmica, quando em contacto com fluidos ou substâncias básicas, formando uma forte aderência. No decorrer da polimerização estes libertam grandes quantidades de calor que está directamente relacionado com o tamanho da cadeia. Quanto maior for o tamanho da sua cadeia, haverá conseqüentemente menor flexibilidade, e maior será a quantidade de calor libertado.

A sua toxicidade está relacionada com a libertação de formaldeído e outros produtos, aquando da sua degradação no organismo. De referir que associada a esta toxicidade surgem respostas inflamatórias, alérgicas, toxicidade neural e o seu potencial mutagénico. Daí que, apesar da sua fácil aplicação e adesão, a FDA (*Food and Drug Administration*) teve grandes dificuldades na sua aceitação [25]. Actualmente existem no mercado dois adesivos à base de cianoacrilatos: o *Dermabond*, comercializado pela empresa *Johnson&Johnson Gateway*[®], e o *Histoacryl*, comercializado pela *Braun* [26].

1.3.4.2. Fibrina

Os adesivos fibrínicos resultam da combinação de dois componentes de coagulação do sangue: o fibrinogénio e a trombina. A trombina, sendo uma protease coagulante do fibrinogénio, é essencial na regulação da velocidade da polimerização do fibrinogénio em fibrina. Quando estes componentes estão liofilizados, antes da sua aplicação, são solubilizados com soluções de aprotinina (produto antifibrinolítico, cuja função é inibir ou tornar mais lenta a degradação do coágulo por uso de enzimas proteolíticas). A mistura dos dois componentes, quando na presença do cálcio ionizado (CaCl_2), reproduz a última fase do processo da coagulação e conduz à polimerização gradual do fibrinogénio, principal proteína estrutural do sangue que, com as plaquetas, forma os coágulos.

Estes adesivos apresentam resultados histopatológicos satisfatórios, pois não estão associados a processos inflamatórios ou necroses. No entanto, a sua principal desvantagem prende-se com o risco de transmissão de doenças virais, como por exemplo, o HIV ou a Hepatite B.

Uma das possíveis soluções para este problema passa pela utilização de fibrinogénio do próprio paciente, técnica esta que requer uma antecipação mínima de dois dias, ao início da cirurgia. Esta situação não é contudo viável em muitas das situações que se apresentam na emergência médica. Associadas a este tempo de espera relativamente prolongado surgem ainda situações em que a condição clínica do paciente não permite que lhe seja extraído o volume de sangue necessário à extracção de componentes para o adesivo. Um exemplo é o de pacientes que sofrem ou sofreram hemorragias significativas.

Actualmente, no mercado existe em um selante de fibrina denominado *Beriplast-P*[®], comercializado pela empresa *Centeon* [25], [26].

1.3.4.3. Gelatina-resorcinol-formaldeído

A gelatina é uma variante do colagéneo. O colagéneo é das proteínas mais abundantes do organismo humano, fazendo parte da constituição da pele, tendões, cartilagens, etc. É um polímero natural, biodegradável e de grande flexibilidade.

É bastante utilizado em cirurgias cardiovasculares, cirurgias torácicas, na correção do aneurisma dissecante da aorta, no bloqueio de fistulas brônquicas, em neurocirurgia e em cirurgias gerais. Existe no mercado um adesivo de gelatina-resorcinol-formaldeído e glutaraldeído, denominado *Colagel*[®], da empresa *Cirurgia Médica*. No entanto está associado a alguns níveis de toxicidade, associadas à presença deste tipo de agentes reticulantes [25].

O *FloSeal Matrix Hemostatic Selant*[®] e o *Proceed*[®] são obtidos a partir da combinação de colagénio e trombina tópica (ambos de origem bovina). O *FloSeal* é comercializado para a homeostase vascular, enquanto que o *Proceed*[®] é mais adequado para a prevenção e tratamento de fugas de fluido cérebro-espinal.

1.3.4.4. Albumina

Este tipo de adesivos são baseados na proteína da albumina, associada a compostos adesivos.

Os seus efeitos inflamatórios e teciduais não são ainda totalmente conhecidos.

Existe apenas um adesivo aprovado denominado *BioGlue*[®], comercializado pela *CryoLife*, que resulta de uma combinação da albumina de bovino com glutaraldeído. A sua aplicação limita-se à reparação de dissecções da aorta [27].

1.3.4.5. Poliuretanas

Este tema será abordado mais detalhadamente, uma vez que o polímero desenvolvido neste trabalho é uma poliuretana.

As poliuretanas (PU) consistem em diversificados arranjos de moléculas poliméricas que partilham em comum a ligação uretana (Figura 1.5). Esta ligação poderá aparecer várias vezes na molécula, mas não necessariamente de uma forma regular. As PU podem ainda ser constituídas por outros grupos funcionais, como por exemplo, grupos éster, éter, alofanato, ureia, amida, entre outros [28].

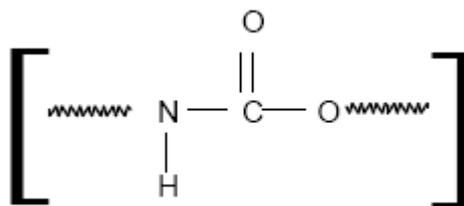


Figura 1.5: Representação do grupo uretana [29].

Pode considerar-se que as características estruturais das poliuretanas se devem simultaneamente aos grupos químicos dos poliésteres e das poliamidas (Figura 1.6) [30].

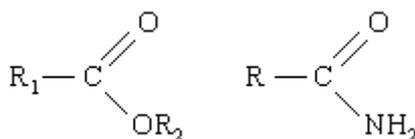


Figura 1.6: Representação dos grupos químicos éster e amida [31].

As poliuretanas são formadas pela reacção entre poliisocianatos (monómeros contendo dois ou mais grupos funcionais isocianato) e polihidróxidos (monómeros contendo dois ou mais grupos hidroxílicos, que podem ser poliésteres ou poliéteres) [32]. Existe no entanto outra forma de produção das PU, que consiste em fazer reagir o biscloroformato com uma diamina [33]. Na Figura 1.7 é possível observar uma reacção de síntese de uma poliuretana.

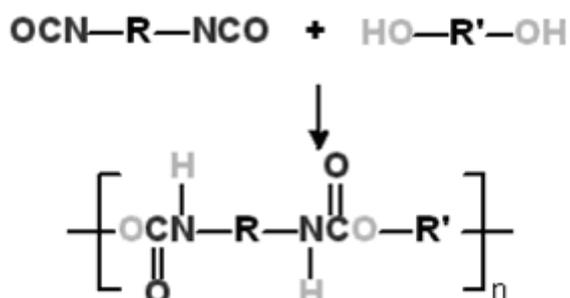


Figura 1.7: Reacção de síntese de uma poliuretana a partir de um diisocianato e de um diol [34].

A sua estrutura molecular pode variar entre polímeros rígidos que originam polímeros termofixos e os elastômeros de cadeias flexíveis que originam polímeros termoplásticos.

As poliuretanas que são polímeros termoplásticos têm estruturas segmentadas, pois resultam da combinação de dois tipos de segmentos, os segmentos flexíveis (SF) devido à presença dos grupos OH, e os segmentos rígidos (SR) que se devem à presença dos grupos NCO [35].

Os segmentos flexíveis possuem baixas temperaturas de transição vítrea³ (T_g), o que determina as propriedades elastoméricas das PU.

Os segmentos rígidos por sua vez têm elevadas temperaturas de transição vítreas, o que lhes confere um certo grau de cristalinidade e uma elevada resistência mecânica. É fundamental o conhecimento do peso molecular e da distribuição dos segmentos para o estabelecimento de correlações estrutura-propriedades [36].

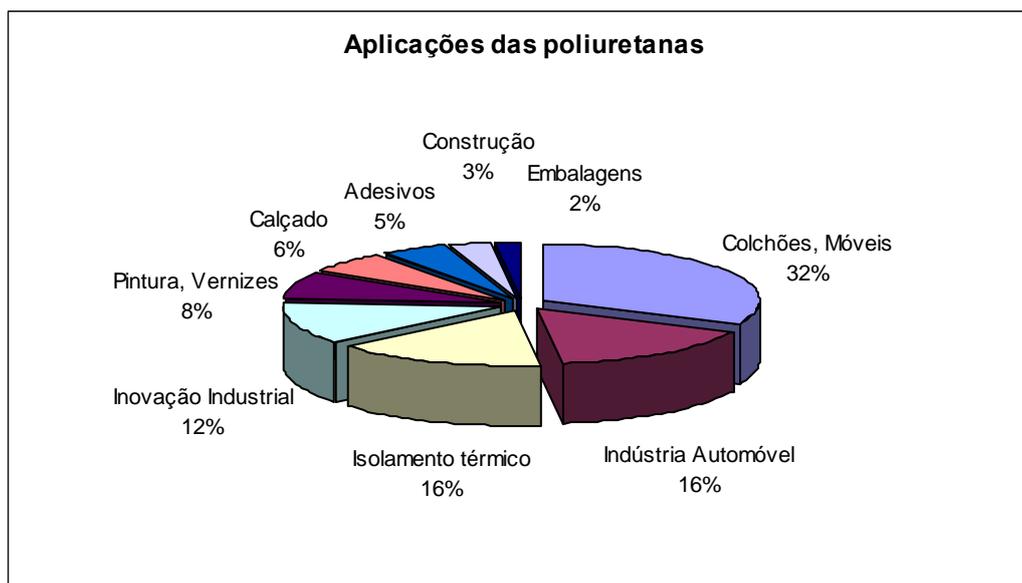
As suas excelentes propriedades físicas e mecânicas, tais como, o elevado módulo de elasticidade que suportam, a compatibilidade fisiológica, a resistência à fadiga e a boa estabilidade, devem-se sobretudo à existência destes dois tipos de segmentos.

Devido a todas as suas vantagens, as PU exibem uma excelente biocompatibilidade, bem como uma boa compatibilidade com o sangue humano [37]. No entanto existem autores que afirmam que as PU baseadas em poliésteres, são mais vulneráveis à biodegradação, existindo mesmo várias enzimas e microrganismos responsáveis pela sua degradação [30].

Os vários tipos de PU que podem existir, quer pela combinação dos dois tipos de segmentos, quer pelos grupos químicos que estas possam ter, permitem que estas tenham uma grande diversidade de aplicações.

Assiste-se hoje em dia ao uso, cada vez mais frequente, das PU nas mais variadas áreas. Quer na indústria automóvel, quer na produção de espumas para colchões e estofos, ou até ao nível da construção civil, as PU têm assim uma vasta utilização. No Quadro 1.2 pode visualizar-se uma representação da distribuição das PU nas várias áreas de aplicação.

³ Temperatura de transição vítrea – temperatura de passagem de um estado vítreo para um estado maleável, sem ocorrência de uma mudança estrutural na molécula.

Quadro 1.2: Representação das várias áreas de aplicação das PU [38].

Para além da sua utilização nas áreas referidas, deve destacar-se a sua aplicação na área da medicina. Ultimamente tem-se assistido a uma crescente aplicabilidade das PU na área dos biomateriais, no sentido de melhorar a qualidade de vida dos doentes, ou de um melhoramento dos serviços prestados.

1.3.4.5.1. Aplicações biomédicas das poliuretanas

Tal como referido anteriormente, a excelente biocompatibilidade com organismos biológicos, a boa compatibilidade sanguínea e celular, bem como a sua grande resistência à biodegradação, fazem das PU um dos polímeros mais utilizados como biomateriais.

Actualmente a sua aplicação é vastíssima, como em implantes vasculares (devido à sua óptima estabilidade hidrolítica), em sacos para o sangue, em adesivos, em fios de sutura, assim como no fabrico de corações artificiais, uma vez que fornecem um mínimo de reacções inflamatórias. Este polímero, quando implantado, não proporciona reacções teciduais adversas, não é tóxico e não altera as concentrações das proteínas sanguíneas.

De seguida, serão focadas as várias PU comercializadas no mercado, bem como as suas principais aplicações. A saber: *Angioflex*[®], comercializada pela empresa *Abiomed*, é um poliéter baseado num plástico de poliuretana que exhibe uma excelente compatibilidade

com o sangue, entrando na constituição do *AbioCor*[®]. O *AbioCor*[®] pode funcionar como um coração artificial contendo titânio, empregue em casos de doença coronária; *Cardiothane*[®] é um óxido de polietileno revestido com uma poliuretana, também com uma boa compatibilidade sanguínea, comercializada pela empresa *Kontron, Inc.*, usada frequentemente em cateteres; *Chronoflex*[®], comercializada pela *PolyMedica*, e tendo por base um polímero alifático, é usado em implantes de cateteres; *Hemothane*[®], esta poliéterureia aromática comercializada pela empresa *Sarns*, é amplamente usada em implantes ao nível das válvulas do coração, em corações artificiais, em cateteres e *stents*; *Mitrathane*[®], comercializada também pela *PolyMedica*, é uma poliéterureia aromática utilizada no encerramento de feridas, apresentando uma estrutura bastante porosa; *Surethane*[®], comercializada pela *Cardiac Control*, feita à base de uma Lycra purificada, foi desenvolvida para dar resposta ao tratamento de problemas nas articulações das cartilagens e do joelho; *Tecoflex*[®], comercializada por *Thermedics*, baseada num éter alifático, é um elastómero termoplástico nomeadamente usado em *stents* esofágicos [32], [39-42].

1.4. Agarose

Ao longo deste trabalho, utilizou-se a agarose como um dos polímeros base para o desenvolvimento do adesivo. Sendo assim, a abordagem a este polímero é fundamental. A agarose, um dos componentes do ágar, é obtida a partir das algas vermelhas *Gelidium Sesquipedale*. Além destas algas, ainda existem outros subgrupos, entre os quais: *Chlorophyta* ou algas verdes, *Phaeophytas* ou algas castanhas, as *Rhodophyta* ou algas vermelhas e as *Cyanophyta* ou algas azuis.

As *Rhodophyta* (de onde se extrai a agarose) são popularmente conhecidas como algas vermelhas e apresentam uma coloração vermelha característica (Figura 1.8). São constituídas por vários e diferentes pigmentos fotossintéticos, clorofilas *a* e *d*, carotenóides, ficocianina, sendo que a sua cor se deve essencialmente à ficoeritrina (pigmento vermelho). Com cerca de 6000 espécies, a maior parte é proveniente de mares tropicais e somente uma pequena parcela é de água doce. Em Portugal existem principalmente no Algarve, em Sesimbra e em Espinho.

São algas pluricelulares, ou que existem sob a forma de colônias unicelulares. Possuem morfologia filamentosa e vivem geralmente fixas a rochas ou a outras algas. As suas paredes celulares são bastante ricas em carbonato de cálcio o que lhes confere flexibilidade e resistência.

São algas ecologicamente e economicamente importantes, uma vez que reforçam a formação de recifes de corais e, estão envolvidas na concepção de produtos usados na indústria farmacêutica, médica e alimentícia.



Figura 1.8: Exemplos de algas vermelhas [43].

O ágar-ágar um polissacarídeo muito complexo constituído principalmente por galactose e anidro-galactose. É extraído da parede de diversos géneros e espécies de algas marinhas vermelhas. O seu teor em agarose varia de acordo com as condições do mar: concentração de dióxido de carbono, tensão de oxigénio, temperatura da água e intensidade de radiação solar. É formado por substâncias mucilaginosas polissacarídicas, que tem por base a galactose e o amido rodoficiano, constituintes estruturais da parede celular das algas.

A agarose é um polímero composto de subunidades de galactose. Quando dissolvida em água quente e seguidamente arrefecida, toma uma consistência gelatinosa.

Normalmente é vendida sob a forma de pó ou em tiras de algas secas. Tem um aspecto esbranquiçado e semi-translúcido [44-46]. Para além das aplicações acima referidas, a

agarose é muito usada em microbiologia, como forma de substrato para meios de cultura sólidos para fungos e bactérias.

1.5. Citocompatibilidade

1.5.1. Tecido conjuntivo e fibroblastos

O organismo humano é composto por quatro tipos diferentes de tecidos, ou seja, conjuntos de células e de elementos intercelulares de origem embrionária, especializados em determinadas funções. Os quatro tecidos básicos, ou primários, dividem-se em:

- tecido epitelial;
- tecido conjuntivo;
- tecido nervoso;
- tecido muscular.

Todos os tecidos básicos são constituídos por vários sub-tipos de tecidos.

Será dado maior ênfase ao tecido conjuntivo pois o trabalho de adesão celular aqui descrito incidiu sobre os fibroblastos.

O tecido conjuntivo apresenta um papel fulcral no preenchimento dos espaços entre as células e na sustentação de outros tecidos. Tem como outras funções o armazenamento e transporte, nomeadamente de electrólitos e água, e a defesa e reparo do organismo, pois é composto por várias células que estão envolvidas na cicatrização de lesões.

A maioria dos tecidos conjuntivos tem origem mesodérmica (tecidos conjuntivos do tronco e membros), sendo que os tecidos conjuntivos da cabeça derivam das células de cristais neurais (neuroectoderma).

Da sua constituição fazem parte vários tipos de células e uma matriz extracelular, nas quais as células ficam imersas. Esta engloba fibras de colagénio, fibras reticuladas e fibras elásticas, fluido intersticial e substância fundamental amorfa, que fornece rigidez à matriz.

As fibras de colagénio, constituídas pela proteína do colagénio, podem ser encontradas na derme, em tendões, no osso, em ligamentos e em fibrocartilagens, sendo abundantes e

resistentes. São produzidas pelos fibroblastos, condroblastos e pelos osteoblastos. As fibras reticulares são constituídas por colagénio do Tipo III, são fibras mais delicadas e formam redes extensas em torno de células de gordura e próximo do epitélio. As fibras elásticas são formadas pela proteína da elastina e pela glicoproteína fibrilina. São fibras delgadas e longas, podendo às vezes apresentarem-se ramificadas. As células musculares lisas e os fibroblastos estão assim envolvidos na sua formação. A substância fundamental amorfa é um gel transparente e hidratado que facilita a passagem de células, moléculas hidrossolúveis e iões, impedindo a entrada de microrganismos. É constituída por proteínas proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas de adesão, diferindo dos restantes tecidos pois tem na sua constituição matriz extracelular, enquanto que os outros são constituídos maioritariamente por células [47], [48].

No Quadro 1.3 está apresentado de forma sumária a grande variedade de tecidos conjuntivos que existe. A diferença entre eles está relacionada com a variação da composição e com a quantidade dos seus elementos constituintes, bem como as características funcionais e estruturais distintas.

Na Figura 1.9 podemos visualizar as diferenças entre os vários sub-tipos de tecido conjuntivo.

Quadro 1.3: Sub-tipos do tecido conjuntivo.

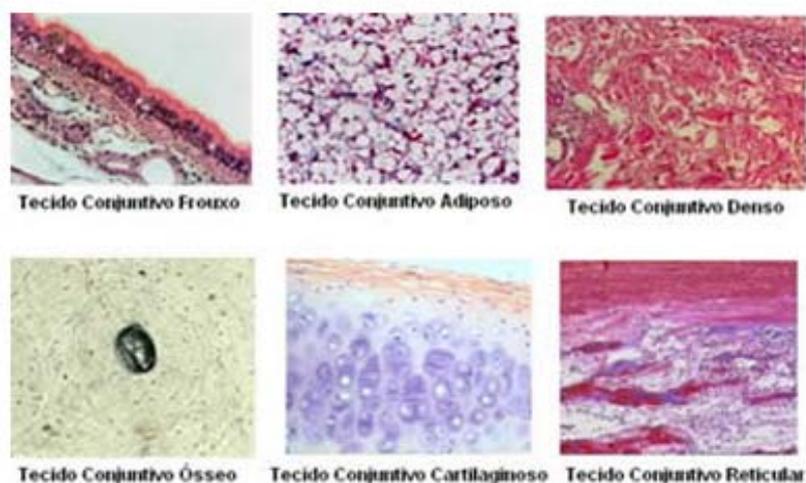
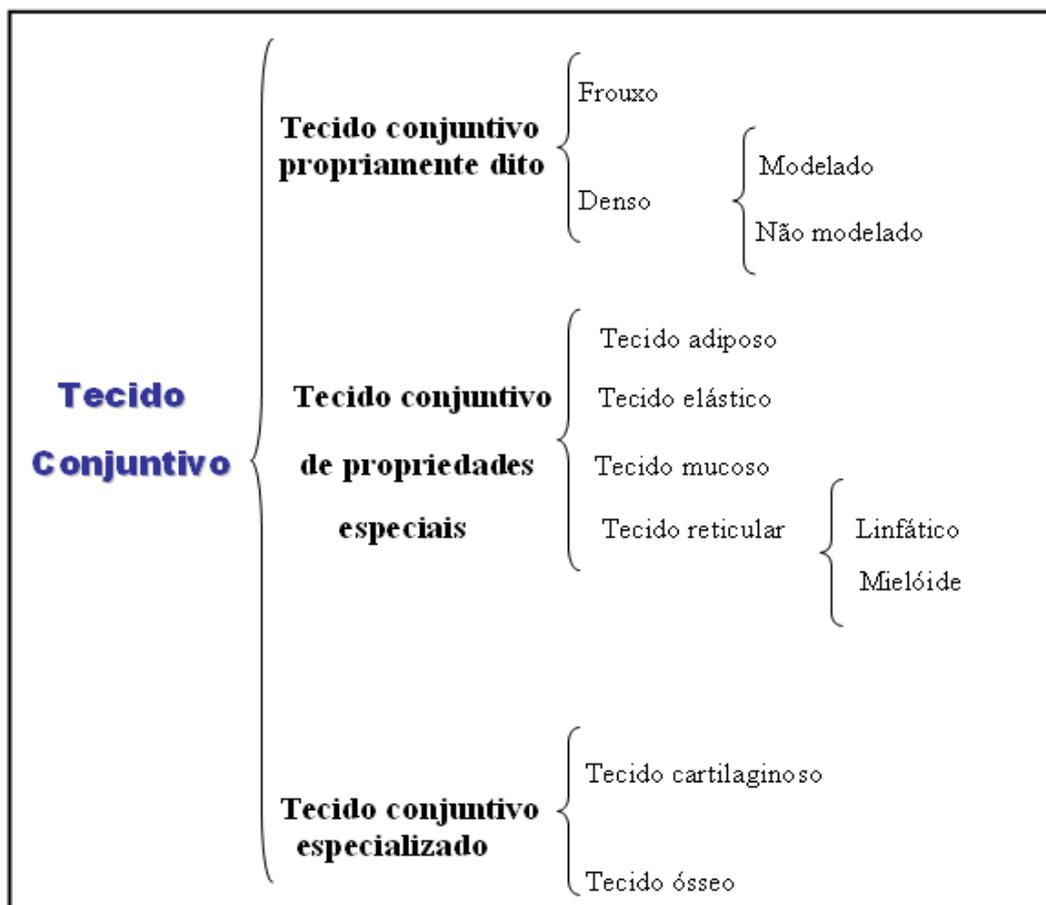


Figura 1.9: Classificação dos diferentes tipos de tecido conjuntivo [49].

As células do tecido conjuntivo têm diferentes formas e funções. Algumas são produzidas localmente e permanecem no tecido conjuntivo, outras só permanecem neste temporariamente. Entre elas podemos referir os adipócitos, condrócitos, eosinófilos, fibroblastos, leucócitos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e plasmócitos.

Nos locais onde existe desenvolvimento do tecido conjuntivo frouxo, existem células mesenquimais que rapidamente se transformam em fibroblastos. Estas células com elevado poder de síntese, podem transformar-se noutros tipos de células, como por exemplo, em células adiposas, em células de revestimento endotelial, em células musculares, etc.

O termo fibroblasto significa formador de fibras (*blastos*), e é exactamente essa a sua função primordial, formar fibras, para além de produzir e manter os níveis de substância fundamental. É a célula que existe em maior abundância no tecido conjuntivo [48]. São células com prolongamentos irregulares, e que apresentam na maior parte das vezes um aspecto estrelado. Têm um citoplasma ramificado, um núcleo ovóide e grande, com cromatina fina e entre 1 a 2 nucléolos. Quando activos, possuem no seu citoplasma retículo endoplasmático rugoso em abundância e o seu aparelho de Golgi é bastante desenvolvido.

São responsáveis pela síntese das proteínas de colagénio, elastina, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas de adesão. Estão também envolvidos na produção dos factores de crescimento, auxiliando o crescimento e diferenciação celular.

Os fibroblastos quando amadurecem dão origem aos fibrócitos, que são células menores e com um metabolismo quiescente. Contrariamente aos fibroblastos, tendem a ter um aspecto fusiforme, possuem poucos prolongamentos citoplasmáticos, têm um núcleo menor e pouca quantidade de retículo endoplasmático. Estes são responsáveis pela biossíntese de colagénio do Tipo I, pela produção de substância intercelular, pela regeneração dos tecidos e pela produção de células de outros tecidos conjuntivos [47].

Os fibroblastos são activados por mediadores químicos no decorrer do processo de cicatrização. São facilmente cultiváveis, sendo que as suas culturas são usadas no tratamento de doenças metabólicas do tecido conjuntivo. A ingestão de certas substâncias tóxicas pode conduzir a uma inibição da síntese de elastina.

Este tipo de células raramente se encontra em divisão na fase adulta do indivíduo, salvo excepções em que o organismo assim o requer.

1.5.2 Teste do MTT

O ensaio colorimétrico do MTT é amplamente utilizado na determinação da viabilidade celular. Este método avalia a citotoxicidade, a proliferação e a activação dos fibroblastos. Este teste detecta as células vivas e consequentemente o seu grau de activação. É baseado na capacidade que as enzimas mitocondriais (desidrogenases), presentes nas células vivas, têm em clivar os anéis tetrazólio do MTT formando cristais *formazan* de cor azul escura. Dá-se assim uma conversão de cor do MTT de amarelo para azul. O facto das células se apresentarem viáveis possibilita a acumulação dos cristais no interior destas. O número de células vivas é proporcional à quantidade de cristais *formazan* produzidos. A medição das células viáveis é feita recorrendo ao aparelho da microELISA, que efectua a sua leitura no comprimento de onda do corante azul (540 nm), e com um filtro de referência a 620 nm.

Este teste é caracterizado pela alta precisão, rapidez, fiabilidade dos resultados associado ao facto de não ser necessário o uso de um radionuclídeo [50].

1.6. Referências bibliográficas

- [1] www.ibi.org.br/Artigos/Materiais%20substitutos%20e%20indutores.htm. Consultado em 10.08.2008.
- [2] Bronzino, J. D. (2000). *The Biomedical Engineering Handbook*. 2nd Edition. Capítulo IV. ISBN 0-8493-0461-X.
- [3] Eloise Berwig, Preparação e caracterização de Filmes de Poliuretano com Potencial Aplicação na Libertação Controlada de Fármacos, Tese de Mestrado, UFSC, 2006.
- [4] João Carlos Ramos, Polímeros Quirais, Tese de Doutoramento, UFP, 2007.
- [5] Chang, R. (1994). *Química*. 5^a Edição. McGraw-Hill. pp 372. ISBN 972-9241-68-6.
- [6] Smith, W. F. (1996). *Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais*. 3^a edição. McGraw Hill. Capítulo 6. ISBN 972-8298-68-4.
- [7] Decker, C. (2002). Kinetic Study and New Applications of UV Radiation Curing. *Macromolecular Rapid Communications*. 23: 1067-1093.
- [8] Corrales, T., Catalina, F., Peinado, C., Allen, N. S. (2003). Free radical macrophotoinitiators: an overview on recent advances. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 159: 103-114.

- [9] Moon, J. H., Shul, Y. G., Han, H. S., Hong, S. Y., Choi, Y. S., Kim, H. T. (2005). A study on UV-curable adhesives for optical pick-up: I, Photo-initiator effects. *International Journal of Adhesion & Adhesives*. 25: 301-312.
- [10] Adaptado de Decker, C. (2002). Kinetic Study and New Applications of UV Radiation Curing. *Macromolecular Rapid Communications*. 23: 1067-1093.
- [11] Decker, C. (2002). Light-induced crosslinking polymerization. *Polymer International*. 51: 1141-1150.
- [12] Allen, N. (1996). Photoinitiators for UV and visible curing of coatings: mechanisms and properties. *Journal of PhotoChemistry and PhotoBiology*. 100: 101-107.
- [13] Williams, C. G., Nalik, A. N., Kim, T. K., Manson, P. N., Elisseeff, J. H. (2005). Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials*. 26 (11): 1211-1218.
- [14] Maharaj, D., Sharma, D., Ramdass, M., Naraynsingh. (2002). Closure of traumatic wounds without cleaning and suturing. *Postgraduate Medical Journal*. 78: 281-282.
- [15] Maticic', D., Kreszinger, M., Pirkic', B., Vnuk, D., Radisic', B., Gracner, D. (2005). Comparative study of skin closure in dogs with polypropylene and polyglactin 910. *Veterinarski Arhive*. 75 (5): 383-390.
- [16] <http://portal.ua.pt>. Consultado em 10.08.2008.
- [17] Sarifakioglu, E., Sarifakioglu, N. (2006). Dressing spray enhances the adhesive strength of surgical dressing tapes. *Indian Journal of dermatology, venereology and leprology*. 72: 353-356.
- [18] Oakley, E. Wound Management.
- [19] www.insorb.com. Consultado em 10.08.2008.
- [20] Adaptado de www.insorb.com. Consultado em 10.08.2008.
- [21] Reece, T. B., Maxey, T. S., Kron, I. L. (2001). A Prospectus on Tissue Adhesives. *American Journal of Surgery*. 182: 40S-44S.
- [22] Troot, A. T. (1997). Cyanoacrylate tissue adhesives an advance in wound care. *Journal of the American Medical Association*. 277 (19): 1559-1560.
- [23] Rimpler, M. (1996). Gluing-a challenge in surgery. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 16 (1): 17-20.
- [24] Lipatova, T. E. (1986). Medical polymer adhesives. *Advanced Polymer Science*. 79: 65-93.

- [25] Fontes, C. E. R., Fagundes, D. J., Ferreira, M. V., Taha, M. O., Filho, O. P., Mardegan, M. J. (2006). Study of Repair of Rat's Colon with Serosal of Jejunal Wall using Cyanoacrylate and Fibrin Glue. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 33 (2): 68-73.
- [26] P. Ferreira, Preparação e caracterização de adesivos de base uretana, Tese de Doutorado, FCTUC, 2007.
- [27] Ryou, M., Thomson, C.C. (2006). Tissue Adhesive: A Review. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*. 8 (1): 33-37.
- [28] Melo, J. S. S., Moreno, M. J., Burrows H. D. & Gil, M. H. (2004). *Química de Polímeros*. Imprensa da Universidade de Coimbra. pp 35-60. ISBN 972-8704-22-4.
- [29] Lima, J. E. S. (2001). Estudo e Desenvolvimento de argamassa elastomérica com base uretânica. Disponível em www.geocities.com/certas2002br/poliuretano.pdf. Consultado em 10.06.08.
- [30] Chandra, R., Rustgi, R. (1998). Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science, Elsevier Science*. 23: 1287.
- [31] Figura adaptada de web.educom.pt/fq/orgânica. Consultado em 8.08.2008.
- [32] Bordado, J. C., Gil, M. H., Ferreira, P., Clara, M. N. (2004). *Síntese de poliuretanos, Aplicações*. Química de Polímeros. Imprensa da Universidade de Coimbra. Capítulo II.2, pp.37-39.
- [33] Stevens, M. P. (1999). *Polymer Chemistry an introduction*. 3rd edition. Oxford University Press, Inc. pp 96. ISBN 0-19-512444-8.
- [34] Figura retirada de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Poliuretano>. Consultado em 8.08.2008.
- [35] Campos, E., Cordeiro, R., Alves, P., Rasteiro, M. G., Gil, M. H. (2008) Polyurethane-based microparticles: Formulation and influence of process variables on its characteristics. *Journal of Microencapsulation*. 25(3): 154-169.
- [36] Almeida, C. L., Gonçalves, D., Pinto, M. R., Akcelrud, L. (2000). Síntese e Caracterização de Poliuretanos Segmentados contendo Blocos de Peso Molecular Controlado, Parte 2: Correlações entre Morfologia e Comportamentos Térmico e Mecânico. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 10(4): 193-201.
- [37] Bhat, S. V. (2002). *Biomaterials*. Alpha Science International Ltd. pp.64, 65. ISBN 1-84265-027-0.
- [38] Dados retirados de: Workshop de Poliuretanos, Prof. J. C. Bordado, Aveiro, 2005.
- [39] www.bardaccess.com/chronoflex. Consultado em 8.08.2008.
- [40] www.abiomed.com/products/faqs.cfm. Consultado em 8.08.2008.

[41] <http://www.freepatentsonline.com>. Consultado em 8.08.2008.

[42] <http://www.patentstorm.us/patents>. Consultado em 8.08.2008.

[43] www.wikipedia.pt. Consultado em 10.08.2008.

[44] <http://www.simbiotica.org/rodofita.htm>. Consultado em 10.08.2008.

[45] <http://pt.wikipedia.org/wiki/Rhodophyta>. Consultado em 10.08.2008.

[46] www.agargel.com.br. Consultado em 10.08.2008.

[47] Junqueira, L. C., Carneiro, J., (2004). *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. Capítulo 5. ISBN 85 277-0906-6.

[48] Ham, A. W. (1977). *Histologia*. 7ª Edição, Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. Capítulo 5. ISBN 85 277-0906-6.

[49] Figura retirada de <http://www.brasilecola.com/biologia/tecido-conjuntivo.htm>. Consultado em 1.08.2008.

[50] Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*.65: 1-2.

Capítulo II

Processos de caracterização

Após a síntese dos pré-polímeros estudaram-se algumas técnicas de caracterização com o objectivo de perceber que propriedades dos materiais se alteraram e que outras surgiram com esta modificação.

2.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada

(FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho é uma análise quantitativa e qualitativa efectuada a vários tipos de amostras (sólidas, líquidas, pastas, adesivos, filmes, entre outras) [1]. É uma técnica rápida e simples, que estuda as estruturas dos materiais sujeitos a análise, permitindo a sua caracterização química e a identificação dos grupos funcionais existentes. Permite ainda analisar substâncias desconhecidas numa amostra, assim como verificar a qualidade e consistência das mesmas.

A radiação infravermelha (IV) compreende a radiação entre os 0,8 μm e os 300 μm , sendo dividida em infravermelho distante (16 μm a 300 μm), médio (2,0 μm a 16 μm) e próximo (0,8 μm a 2,0 μm). Para as análises em causa usou-se a região espectral do infravermelho médio.

Esta radiação não possui energia suficiente para elevar os electrões a níveis energéticos superiores, como no caso da radiação visível e ultravioleta. Sendo assim, a molécula ao ser atravessada por um feixe de luz infravermelha vai absorver energia num comprimento de onda característico, convertendo-a em movimentos vibratórios das ligações covalentes. Os movimentos vibratórios podem dividir-se entre os de alongação (simétrica ou assimétrica) e os de deformação angular (assimétrico no plano, assimétrico fora do plano, simétrico no plano e simétrico fora do plano) [2]. Cada grupo funcional químico sofre alongação ou deformação e vibra a uma frequência característica. Esta informação pode ser visualizada na Figura 2.1, que mostra uma tabela de correlação entre os diferentes grupos químicos e as correspondentes bandas de absorção.

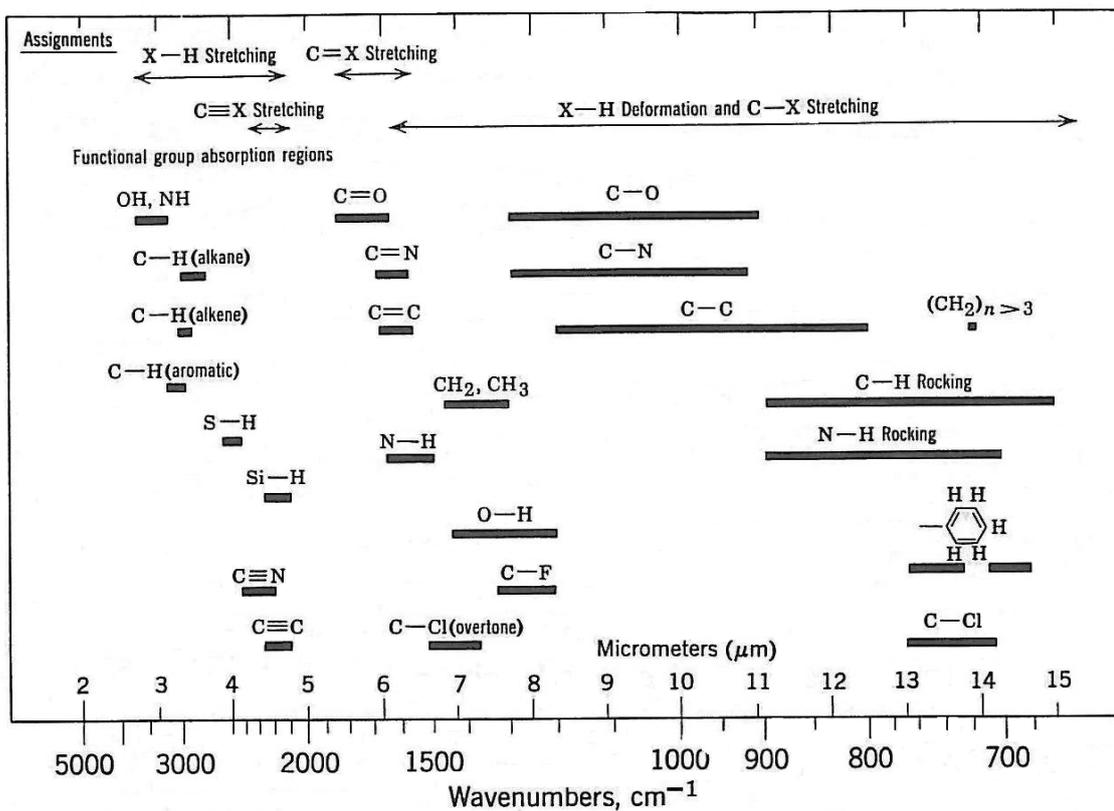


Figura 2.1: Regiões de absorção da radiação infravermelha em polímeros [3].

A radiação infravermelha é emitida por uma fonte e passa através de um orifício que controla a quantidade de energia que chega à amostra. O feixe de radiação atinge um interferômetro e posteriormente a amostra, sendo encaminhado para o detector que vai medir o sinal final. Posteriormente ocorre uma digitalização e processamento do sinal segundo a transformada de Fourier, feita pelo software do computador que está acoplado ao sistema. No final é apresentado um espectro que define a transmitância (equação 2.1), ou a absorvância (equação 2.2), em função do número ou do comprimento de onda [4-6].

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{eq. 2.1})$$

$$A = \log_{10} T \quad (\text{eq. 2.2})$$

Na Figura 2.2 está esquematizado o funcionamento do sistema de ATR-FTIR.

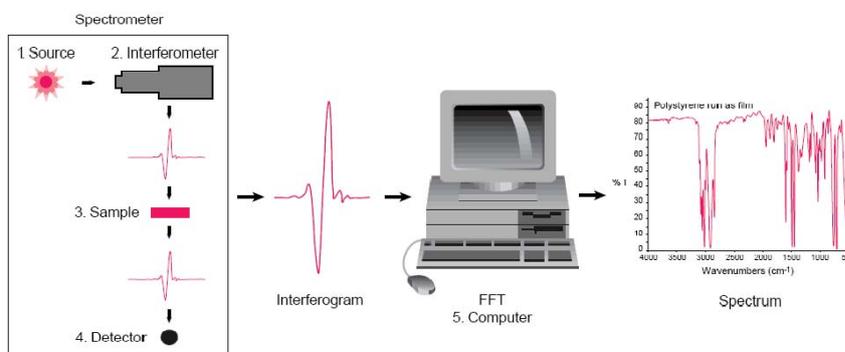


Figura 2.2: Esquematização do funcionamento do ATR-FTIR [7].

A importância desta técnica de caracterização neste trabalho reside na possibilidade de acompanhar a polimerização fotoquímica, bem como a detecção dos grupos uretana resultantes da reação de síntese.

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

O *swelling* ou capacidade de absorção de água é um factor determinante na preparação de um adesivo biológico. É definido como o aumento de volume das amostras em estudo, em resultado da absorção espontânea de água. A capacidade de absorção de água é expressa em percentagem e determina-se recorrendo à equação 2.3.

$$\text{Capacidade de absorção (\%)} = \left(\frac{W_h - W_s}{W_s} \right) \times 100 \quad (\text{eq. 2.3})$$

Onde:

W_h – peso hidratado da amostra

W_s – peso seco da amostra

Um polímero pode ser classificado, relativamente à sua capacidade de absorção de água, em três classes [8]:

- Hidrofóbicos: *swelling* <1%
- Ligeiramente hidrofílicos: $1 < \textit{swelling} < 10\%$
- Hidrofílicos: *swelling* > 10%

São vários os factores que afectam a hidrofilicidade ou a hidrofobicidade do polímero, entre eles, a geometria do polímero, a existência de grupos reactivos, o pH, e a maior ou menor porosidade da superfície.

Após a ocorrência de uma ferida e consequente perda dos tecidos envolventes, ocorre o chamado processo de cicatrização. Este é caracterizado por uma série de eventos celulares e moleculares que, através de vários passos (coagulação, inflamação, proliferação, contracção da ferida e remodelação), promovem a reestruturação e a reconstituição dos tecidos [9]. No processo de adesão aos tecidos biológicos, o adesivo deve servir como um apoio mecânico constante, para manter as bordas do tecido aproximadas e promover o mecanismo da cicatrização [10]. O aumento de volume da amostra apresenta aqui um papel fulcral neste processo de cicatrização. Se o polímero “inchar” até um valor óptimo de volume, poderá contribuir para a homeostase do processo de cicatrização; caso “inche” em demasia, poderá provocar danos nos tecidos envolventes.

A importância deste estudo prende-se com a necessidade de compreender qual o comportamento e o carácter (hidrófobo ou hidrófilo) deste adesivo em ambientes húmidos, característicos do organismo humano, para poder concluir da sua eficácia.

2.3. Testes de adesão em gelatina

A forma mais simples para aderir tecidos biológicos a um adesivo é formar uma ligação forte e coesa. Existem vários mecanismos que permitem estabelecer esta ligação entre um adesivo e o seu substrato, assim como são vários os factores que a influenciam.

Quando se promove a adesão entre duas estruturas, as características mecânicas resultantes dependem das propriedades dos dois materiais. A ligação entre um adesivo e uma superfície envolve atracções moleculares, existindo um balanço entre as forças electrostáticas de repulsão e as forças atractivas de Van der Waals [11]. O aumento da força desta ligação pode dever-se às ligações químicas existentes à superfície, às interdigitações macromoleculares e/ou às elongações que podem ocorrer [12]. Características como a rugosidade, a deformação dos materiais ou a energia de superfície, têm influência na força da ligação [12].

Com o objectivo de estudar o tipo e a força da ligação do pré-polímero de base uretana com os tecidos biológicos, fez-se uma simulação aderindo o pré-polímero fotopolimerizado a dois folhetos de gelatina, como se pode observar na Figura 2.3. Os folhetos de gelatina representam aqui os tecidos biológicos devido à constituição semelhante em grupos amínicos.



Figura 2.3: Esquema representativo dos folhetos de gelatina com a amostra.

Onde:

- 1 – folheto de gelatina
- 2 – pré-polímero
- 3 – folheto de gelatina

Como referimos anteriormente, para avaliar a força e a consistência da ligação entre o pré-polímero e os folhetos de gelatina, foram efectuados ensaios mecânicos numa máquina universal de ensaios *Chatillon™ TCD-1000*.

Esta máquina permite realizar testes de tensão testando a resistência e as tensões de ruptura dos materiais [13]. É constituída por duas garras que permitem manter presa a amostra a analisar. Por sua vez, as garras estão associadas a 2 travessas, uma fixa e outra móvel. Esta última tem como função gerar uma carga efectuando um movimento ascendente ou descendente sobre a garra à qual está acoplada, bem como controlar a velocidade desse movimento.

A amostra é submetida a uma tensão de corte ocorrendo a sua deformação até à separação dos dois folhetos, quer por quebra, quer por descolagem da gelatina. A tensão de corte é uma tensão tangencial, definida como a razão entre a força de corte exercida e a área sobre a qual a força actua, força esta exercida de forma não uniaxial [14]. A força aplicada na amostra, bem como a sua deformação, vão sendo registadas ao longo do ensaio pelo software da máquina de ensaios. O ensaio termina quando ocorre a separação dos dois folhetos e se dá o registo da força de ruptura associada a esta separação. A força de ruptura é a força de tracção máxima, exercida sob unidade de área, que um material consegue resistir.

2.4. Determinação da tensão superficial e da energia de superfície por medição dos ângulos de contacto

Na concepção de um adesivo biológico, a adesão dos materiais, a coesão, a biocompatibilidade e a resistência ao envelhecimento são parâmetros de extrema importância que devem ser conhecidos. A caracterização específica dos materiais, bem como o conhecimento das características da sua superfície são úteis no sentido de desenvolver novos e melhores produtos com qualidades melhoradas. Desta forma, a medição dos ângulos de contacto e das tensões superficiais são imprescindíveis para um melhor conhecimento das interacções sólido-líquido ou líquido-líquido.

Consideremos uma gota de líquido em queda. Esta toma uma forma esférica no sentido de minimizar a sua superfície e também devido à força gravítica existente, ocorrendo no entanto um leve achatamento quando a gota pousa, devido à resistência do ar. Se a gota pousa sobre uma superfície homogênea e nivelada, as superfícies do líquido e do sólido com o qual o líquido está em contacto, formam entre si um ângulo designado por “ângulo de contacto”, como exemplificado na Figura 2.4.

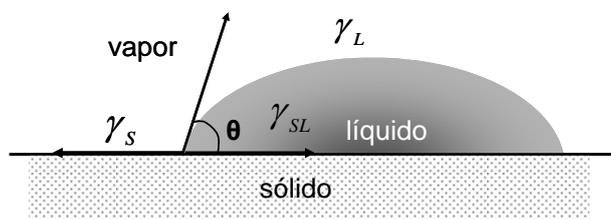


Figura 2.4: Esquema representativo de um ângulo de contacto estabelecido entre uma gota de líquido e uma superfície sólida [15].

O valor deste ângulo vai depender da relação entre as forças de coesão líquido-líquido (que fazem contrair a gota a uma esfera com uma superfície mínima) e as forças de adesão líquido-sólido (que fazem a gota espalhar-se sobre a superfície). Regra geral, quando a gota se expande, temos um ângulo de contacto um pouco maior do que quando esta é menor. Este ângulo, entre o líquido e o sólido, ajusta-se por si mesmo de modo a que a soma das forças seja igual a zero, sendo esta relação descrita pela equação de Young (equação 2.4).

$$\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos \theta \quad (\text{eq. 2.4})$$

Onde:

σ_s – tensão superficial

σ_{sl} – tensão superficial sólido-líquido

σ_l – tensão superficial líquido-líquido

θ – ângulo de contacto

Define-se tensão superficial como a energia por unidade de área ou equivalentemente como a força por unidade de comprimento que uma superfície exerce sobre um corpo, com o qual a superfície está em contacto.

Os valores do ângulo de contacto podem ser diferentes o que conduz a diferentes comportamentos, isto é:

- Se $\theta=0^\circ$, as forças de adesão e coesão igualam-se e diz-se que o líquido molha perfeitamente o sólido;
- Se $0^\circ < \theta < 180^\circ$, o líquido espalha-se na superfície do sólido numa determinada área;
- Se $\theta=180^\circ$, diz-se que o líquido não molha o sólido.

Para a medição dos ângulos de contacto utilizou-se o método de análise de Owens, Wendt, Rabel e Kealble. O método de avaliação destes autores baseia-se na afirmação de que a energia interfacial das moléculas se deve às forças de interacção dispersivas e polares. As forças de interacção dispersivas contêm as interacções de Coulomb entre dipolos permanentes e entre dipolos permanentes e dipolos induzidos, que ocorrem em todas as moléculas existentes. As interacções dispersivas devem-se às flutuações temporárias na distribuição de carga nas moléculas, ocorrendo apenas em moléculas específicas [16]. Obtém-se assim a energia de superfície e a tensão superficial como a soma das duas componentes polar e dispersiva, quer para líquidos, quer para sólidos (equação 2.5 e equação 2.6).

$$\sigma_l = \sigma_l^d + \sigma_l^p \quad (\text{eq. 2.5})$$

$$\sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p \quad (\text{eq. 2.6})$$

Na equação 2.5 σ_l^d e σ_l^p representam respectivamente as componentes dispersivas e polares do líquido. Na equação 2.6 σ_s^d e σ_s^p representam respectivamente as componentes dispersivas e polares do sólido.

A tensão superficial pode ser calculada de acordo com Owens, Wendt, Rabel e Kealble através das contribuições do líquido e do sólido fazendo a média geométrica (equação 2.7).

$$\sigma_{sl} = \sigma_l + \sigma_s - 2(\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p}) \quad (\text{eq. 2.7})$$

Substituindo o valor de σ_{sl} na eq. 2.4, e resolvendo a equação para as incógnitas desconhecidas, obtemos a equação de uma recta (equação 2.8).

$$y = a \cdot x + b \quad (\text{eq. 2.8})$$

Onde:

$$y = \frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\sigma_l}{\sqrt{\sigma_l^d}}; \quad x = \sqrt{\frac{\sigma_l^p}{\sigma_l^d}}; \quad a = \sqrt{\sigma_s^p}; \quad b = \sqrt{\sigma_s^d} \quad (\text{eq. 2.9})$$

Posteriormente através do gráfico de y em função de x retira-se o valor de σ_s^p do declive da recta obtida e o valor de σ_s^d da intersecção com o eixo vertical. É assim possível calcular o ângulo de contacto entre um líquido e um sólido, com a energia de superfície como incógnita [17-19].

2.5. Referências bibliográficas

[1] User's guide *Magma-IRTM Spectrometer System 750*.

[2] Espectroscopia no infravermelho. Disponível em www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG_0599.EXE/4432_4.PDF. Consultado em 21.06.08.

[3] Figura retirada de Billmeyer, JR. F. W. (1984). *Textbook of Polymer Science*, 3rd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 232. ISBN 0-471-82834-3.

[4] www.nuance.northwestern.edu/keckii/ftir1.asp .Consultado em 18.06.08.

[5] *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry* (2001). Thermo Nicolet Corporation. Disponível em mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf. Consultado em 21.06.08.

[6] Diego Zeni, Determinação de cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada, Tese de Mestrado, UFSM, 2005.

[7] Figura retirada de: *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry* (2001).Thermo Nicolet Corporation. Disponível em mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf. Consultado em 21.06.08.

[8] Apontamentos da disciplina de Biomateriais, Engenharia Biomédica, (2006).

[9] Mandelbaum, S. H., Di Santis, É. P., Mandelbaum, M. H. S. (2003). Cicatrization: current concepts and auxiliary resources- Part I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 78(4): 393-410.

[10] Morandini, W., Ortiz, V. (1992). Use of Tissue Adhesives in Surgeries. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo.7:80-85.

[11] Donkerwolcke, M., Burny F., Muster, D. (1998). Tissues and bone adhesives-historical aspects. *Biomaterials*. 19: 1461-1466.

[12] Gay, C. (2002). Stickness – Some Fundamentals of Adhesion. *Intergrative and Comparative Biology*. 42 (6): 1123-1126.

[13] Operating Manual, *TCD-1000 Chatillon™*.

[14] Smith, W. F. (1996). *Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais*. McGraw Hill, 3ª edição. Capítulo 6. ISBN 972-8298-68-4.

[15] Figura retirada de Operating Manual DataPhysics OCA, 2002, *The Fundamentals of contact angle measurements*.

[16] Lugscheider, E., Bobzin, K. (2001). The influence on surface free energy of PVD-coatings. *Surface and Coatings Technology*. 142-144:755-760.

[17] <http://nautilus.fis.uc.pt/personal/mfiolhais/FGbio/aula27.pdf>. Consultado em 23.06.08

[18] <http://nautilus.fis.uc.pt/personal/mfiolhais/FGbio/aula30.pdf>. Consultado em 23.06.08

[19] Operating Manual DataPhysics OCA, 2002, *The Fundamentals of contact angle measurements*, pp.1-8, 29.

Capítulo III

Materiais e métodos

3.1. Reagentes

No Quadro 3.1 encontram-se descritos os reagentes utilizados na preparação do pré-polímero.

Quadro 3.1: Lista dos reagentes utilizados.

Reagente	Especificações	Fabricante
Agarose (C ₈ H ₁₂ O ₆)	Tipo III	Sigma Aldrich
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	Usado sob forma seca e granulada	José M. Vaz Pereira, S.A.
Dimetilsulfóxido (DMSO) (C ₂ H ₆ OS)	Pureza 99%	Fluka
Etilenoglicol (C ₂ H ₄ (OH) ₂)	Pureza 99,8%	Sigma Aldrich
Formamida (CH ₃ NO)	Pureza 99%	Sigma Aldrich
Irgacure[®] 2959 (Ir2959) (C ₁₂ H ₁₆ O ₄)	M _w =224,3	Ciba Speciality Chemicals Inc.
Metacrilato de 2-isocianoetilo (MIE) (C ₇ H ₉ O ₃ N)	Pureza 98%	Sigma Aldrich
Propilenoglicol (C ₃ H ₈ O ₂)	Pureza 99,5%	Sigma Aldrich

3.2. Síntese do pré-polímero

Foram sintetizados pré-polímeros com grupos uretana. Para tal procedeu-se à adição de metacrilato de 2-isocianoetilo (MIE) (Figura 3.1) à agarose (Figura 3.2), de modo a que a proporção entre os grupos OH e NCO fosse de 1:1. Desta forma obtivemos uma poliuretana com ligações duplas nas extremidades.

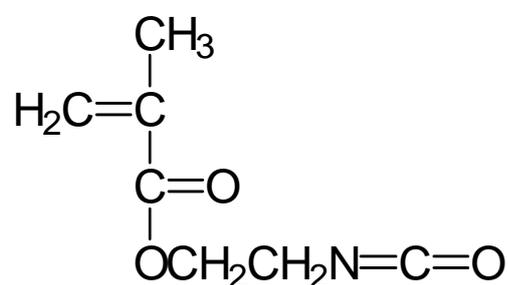


Figura 3.1: Estrutura química do metacrilato de 2-isocianoetilo (MIE) [1].

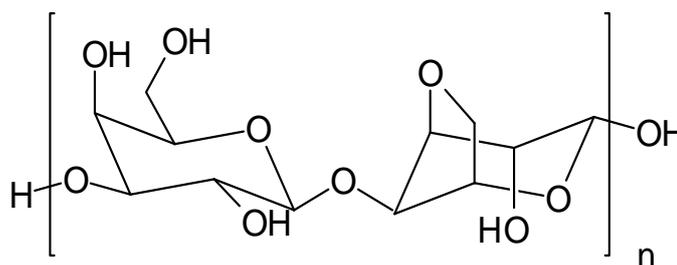


Figura 3.2: Estrutura química da agarose [2].

Utilizou-se como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO) pelas características vantajosas que apresenta. De referir: ser um solvente da agarose, ter uma boa interacção com lípidos e proteínas (constituintes dos tecidos biológicos), possuir baixa toxicidade e ter uma boa acção farmacológica e terapêutica [3].

Foram efectuados estudos para avaliar a acção do DMSO, na prevenção da necrose tecidual induzida pela administração intravenosa de adriamicina. Este composto é um agente anti-tumoral, com um papel importante no tratamento de neoplasias no organismo humano [4]. Os efeitos locais da sua administração em ratos são particularmente severos, podendo em casos mais graves estender-se às estruturas mais internas. Ficou assim comprovado que o DMSO, aplicado conjuntamente com vitamina E (*alpha tocopherol succinate*), é não só capaz de reduzir o tamanho do tecido afectado, bem como prevenir um possível alastramento da necrose. O DMSO é considerado um agente vasodilatador, anti-inflamatório e com capacidade de auxiliar a actividade antibacteriana [5].

Foram efectuadas duas modificações distintas dos grupos OH existentes na molécula de agarose (50% e 75%) e conseqüentemente realizadas duas reacções.

Para tal, para cada uma pesaram-se 2g de agarose numa balança analítica (Precisa Balances, *Precisa 125 A SCS*, Suíça), que foram introduzidas num balão de fundo redondo de 2 tubuladuras com capacidade de 250ml, ao qual se adicionaram 40ml de DMSO. Colocaram-se os respectivos balões num banho quente a 60°C (Placa de aquecimento e agitação magnética Heidolph, MR 2002, Alemanha), com um agitador magnético (J.P. Selecta, Agimatic-N, Espanha) a 100 rpm. As entradas dos balões foram encerradas e numa delas foi colocado um tubo de secagem. Este tubo é constituído por algodão e cloreto de cálcio e tem como função prevenir eventuais entradas de humidade na reacção.

Uma vez solubilizada a agarose no DMSO, procedeu-se à adição de MIE, 2ml para a modificação molecular de 50% e 3ml para a modificação molecular de 75%. Fez-se passar um fluxo de azoto pelas soluções para garantir uma atmosfera inerte e o MIE foi adicionado o mais rapidamente possível a fim de evitar a entrada de humidade do ar para o interior do balão. Posteriormente dividiu-se cada uma das soluções mencionadas por quatro balões de fundo redondo de capacidade de 50ml. As reacções ocorreram durante 24 horas, período após o qual se adicionou o agente fotoiniciador Irgacure[®] 2959 (Figura 3.3).

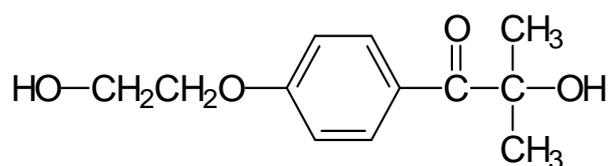


Figura 3.3: Estrutura do Irgacure[®] 2959 (Irg2959) [6].

Acrescentou-se o fotoiniciador nas percentagens de 8%, 10%, 12% e 15%, relativamente ao valor da massa de MIE presente na solução, mantendo-se as condições da reacção anterior.

Após a dissolução total do Ir2959, os balões foram devidamente envolvidos em papel de alumínio para evitar a sua reacção com a luz.

As soluções finais apresentavam uma ligeira viscosidade e um tom amarelado.

3.3. Reticulação fotoquímica

Procedeu-se à polimerização fotoquímica das soluções efectuadas, recorrendo a uma lâmpada de ultravioleta (U.V.) modelo *UVGL-48, Multiband UV, da Mineral light[®] lamp* (Figura 3.4), com uma gama de comprimentos de onda de radiação entre os 254 e 365nm.



Figura 3.4: Lâmpada Ultravioleta *UVGL-48, Multiband U.V., da Mineral light[®] lamp*.

Adicionou-se cerca de 1ml de solução, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, sobre placas de vidro que estavam previamente limpas com etanol e secas, efectuando-se de seguida a irradiação das amostras líquidas. Foram estudados três tempos de irradiação UV: 4min, 5min e 6min, com o objectivo de verificar qual o tempo de polimerização das amostras e também efectuar a sua optimização. Estabeleceram-se assim variadas combinações entre as diferentes modificações moleculares e as diferentes percentagens de Ir2959 presentes nas soluções (8%, 10%, 12% e 15%).

Após polimerização, obtiveram-se membranas transparentes, ligeiramente flexíveis e de aspecto gelatinoso. As mesmas foram guardadas em caixas compartimentadas à temperatura ambiente.

É de salientar que com o passar do tempo e em contacto com o ar, as amostras polimerizadas foram libertando um líquido incolor, pouco viscoso, que consistia no DMSO utilizado como solvente no início da reacção.

3.4. Procedimentos dos processos de caracterização

3.4.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada

(FTIR- ATR)

O estudo da composição química das amostras foi efectuado num espectrofotómetro *Magma-IR™ Spectrometer 750* da *Nicolet Instrument Corp.*, equipado com um “*Golden Gate Single Reflection Diamond ATR*” (acessório ATR de prisma de diamante de reflexão simples) (Figura 3.5). Os espectros foram registados à temperatura ambiente, a 256 scans e com uma resolução de 4cm^{-1} .



Figura 3.5: Equipamento de ATR-FTIR *Magma-IR™ Spectrometer 750*.

Colocou-se uma pequena quantidade da amostra na parte superior do cristal de ATR. As amostras analisadas foram a agarose, a agarose modificada com MIE (para 50% e 75% de modificação da molécula) e por último a agarose modificada com MIE, após adição do fotoiniciador Ir2959 nas várias percentagens existentes e para cada modificação molecular.

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

Para determinar a capacidade de absorção de água das várias membranas preparadas, colocaram-se três amostras de cada, numa estufa (J.P. Selecta, Espanha) à temperatura de 60°C, cerca de 24 horas. Passado este tempo, determinou-se o seu peso seco (W_s) e transferiram-se para frascos de vidro de tamanho pequeno. Estes foram colocados abertos intencionalmente, no interior de vaso fechado que continha uma solução saturada de sulfato de cobre pentahidratado. Esta solução criava uma atmosfera de humidade no interior do recipiente e permitia às amostras a absorção de ar húmido. Determinaram-se os pesos das amostras para diferentes tempos ao longo de 6 dias, tempo após o qual estas atingiram um valor de peso constante, que corresponde ao seu peso hidratado (W_h). A capacidade de absorção de água é determinada recorrendo à equação 2.3 referenciada no Capítulo 2.

$$\text{Capacidade de absorção (\%)} = \left(\frac{W_h - W_s}{W_s} \right) \times 100 \quad (\text{eq. 2.3})$$

3.4.3. Testes de adesão em folhetos de gelatina

Para a execução deste teste, efectuou-se uma fotopolimerização *in situ*, individualmente para cada uma das amostras, sobre os folhetos de gelatina. Posteriormente efectuava-se uma irradiação U.V. de 6min. As amostras finais eram constituídas por dois folhetos de gelatina que continham o pré-polímero apenas numa determinada área, como é exemplificado na Figura 2.3 do Capítulo 2.

De seguida, sujeitaram-se as amostras a ensaios de tracção. O equipamento utilizado para tal efeito foi uma máquina universal de ensaios *Chatillon™ TCD-1000* (Figura 3.6).



Figura 3.6: Máquina universal de ensaios mecânicos *Chatillon™ TCD-1000*.

O esquema representativo das amostras colocadas na máquina universal de ensaios pode ser visualizado na Figura 3.7.

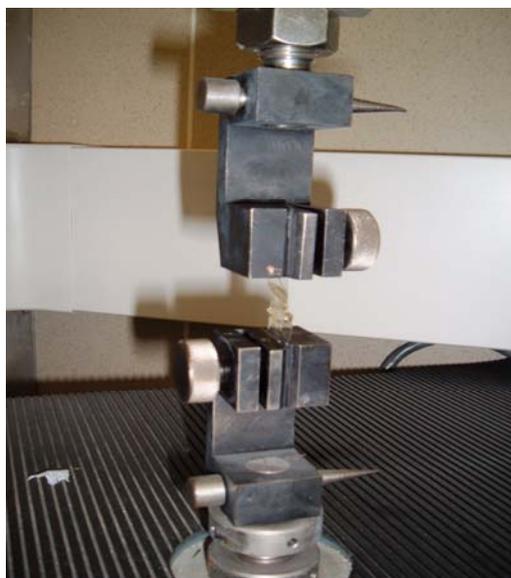


Figura 3.7: Esquema representativo de uma amostra durante um ensaio de tracção.

Neste ensaio é exercida uma força sobre os folhetos de gelatina com as amostras, até à sua quebra ou descolagem. O ensaio decorre nas seguintes condições: à temperatura ambiente, com uma velocidade de afastamento das sondas de 20mm/min e com um *preload* 0,5N, que representa um valor pré-definido de força a partir do qual não existem falsos positivos de alongamento da amostra. Ao longo da duração do teste, o software do programa vai registando a força aplicada às amostras, a correspondente deformação e a extensão do deslocamento das sondas. Foi também efectuado um teste de tracção a um folheto de gelatina sem pré-polímero, irradiado no mesmo tempo (6min), de forma a obter um valor de tensão de ruptura máximo que nos pudesse servir como referência.

3.4.4. Determinação da tensão superficial e da energia de superfície por medição dos ângulos de contacto

Na determinação da tensão superficial do pré-polímero utilizou-se o método da gota pendente, baseado na geração de uma gota bem formada. O formato exterior da gota é determinado pela acção conjunta da força gravítica e da força de tensão superficial, como referido no Capítulo 2.

Para o cálculo da tensão superficial recorreu-se ao método de Young-Laplace, que relaciona a tensão superficial com a curvatura da gota (equação 3.1).

$$\Delta P = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (\text{eq. 3.1})$$

De acordo com a equação 3.1, ΔP representa a diferença de pressão entre o lado côncavo e convexo da superfície, σ representa a tensão superficial e R_1 , R_2 os raios de máxima curvatura em radianos [7].

O método de avaliação de Owens-Wendt-Rabel e Kealble possibilitou o cálculo das componentes dispersiva (σ_s^d) e polar (σ_s^p) dos vários pré-polímeros sintetizados, bem como a energia de superfície (σ_s), medida a partir dos ângulos de contacto estáticos. Para este teste foram utilizados quatro líquidos distintos: água, formamida, etilenoglicol e propilenoglicol.

Utilizou-se o equipamento com suporte de imagem *OCA 20 da DataPhysics* (Figura 3.8).

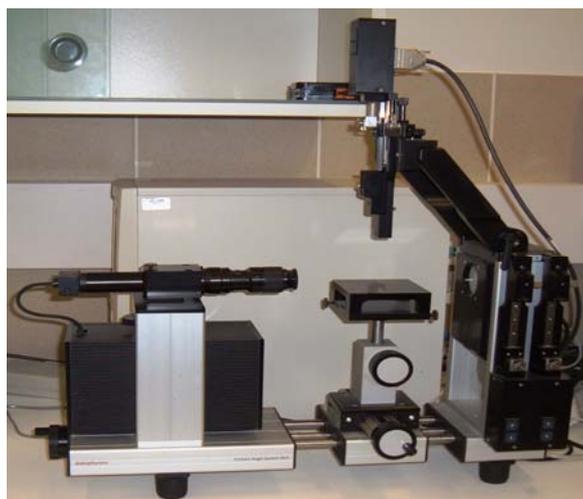


Figura 3.8: Equipamento para medição de ângulos de contacto *OCA 20 – DataPhysics*.

O software permite através de uma câmara, registar uma imagem digital da gota sobre a superfície. *A posteriori* é determinada uma linha de base na interface sólido-líquido e também é feita uma determinação do contorno da gota para, finalmente, se efectuar a medição do ângulo de contacto.

3.4.5. Testes de adesão celular

Após a conclusão dos vários procedimentos de caracterização química iniciaram-se os testes de adesão celular efectuados no Instituto Biomédico de Investigação da Luz e da Imagem (IBILI). As células utilizadas foram fibroblastos de rato *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, estirpe *Wistar* – CharlesRiver, Barcelona) gentilmente cedidas pelo Instituto de Biofísica/Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (IBB-FMUC).

A razão da escolha desta linhagem celular nos testes biológicos prende-se com o facto de os fibroblastos serem células envolvidas no processo de cicatrização. A sua principal função é formar fibras, promovendo desta forma a regeneração dos tecidos.

O conhecimento da interacção entre estas células e as membranas do polímero preparadas, serviram para poder tirar conclusões de uma futura aplicação do adesivo no organismo humano. Para além disto, os fibroblastos são células ideais para a realização de estudos de viabilidade celular/citotoxicidade.

Os ratos são animais vertebrados frequentemente usados em experimentação animal. A sua enorme semelhança fisiológica com o ser humano, o facto da sua filogenia ser 99% igual à dos humanos, associado aos baixos custos e facilidade de manuseamento são razões que justificam o uso de células de rato.

Pretendeu-se com este teste avaliar a compatibilidade biológica das membranas preparadas a partir dos pré-polímeros com as células seleccionadas.

Nestes testes biológicos foi seguida a norma ISO 10993 da Organização Internacional para a padronização (ISO – *International Organization Standardization*). Esta norma aplica-se à avaliação biológica de dispositivos médicos que contactem de forma directa ou indirecta com fluidos corpóreos. A primeira etapa desta avaliação (ISO 10993-1: 2003) é caracterizar o material a testar, etapa efectuada no decorrer dos procedimentos de caracterização. A quinta etapa (ISO 10993-5:1999) diz respeito aos testes para avaliação da citotoxicidade *in vitro*. Esta norma descreve os métodos a ter em conta aquando da avaliação da citotoxicidade de dispositivos médicos, e as normas a obedecer na sua avaliação *in vitro*.

Para obter resultados estatisticamente significativos terão de existir pelo menos cerca de 104 células no meio de cultura [8].

As membranas de polímeros usadas nos testes de adesão são as abaixo indicadas, tendo sido efectuados estudos em triplicado.

- 1 - 50% de modificação da molécula, com 12% de adição de Ir2959;
- 2 - 50% de modificação da molécula, com 15% de adição de Ir2959;
- 3 - 75% de modificação da molécula, com 8% de adição de Ir2959;
- 4 - 75% de modificação da molécula, com 10% de adição de Ir2959;
- 5 - 75% de modificação da molécula, com 12% de adição de Ir2959;
- 6 - 75% de modificação da molécula, com 15% de adição de Ir2959;
- 7 – Meio de cultura juntamente com fibroblastos (controlo).

A nomenclatura numérica acima referida servirá para facilitar a leitura dos resultados aqui apresentados.

Foi efectuado exactamente o mesmo teste de adesão a dois grupos distintos de membranas dos polímeros preparados. O primeiro grupo é constituído por membranas que, após preparação em laboratório, foram sujeitas a diálise durante um período de 4 dias. O segundo grupo é constituído por membranas que não foram sujeitas a este tratamento.

As várias amostras fotopolimerizadas, pertencentes ao primeiro grupo de membranas, foram introduzidas em membranas de diálise (*Dialysis tubing cellulose membrane*, tamanho: 25mm × 16mm, Ref: D9777-100FT, Sigma Aldrich, Alemanha), cujas extremidades se selaram, sendo depois introduzidas num recipiente com água destilada. A água destilada foi substituída, por igual volume, quatro vezes ao longo de cada dia.

A diálise é um processo fisico-químico em que ocorrem trocas entre as duas soluções, de concentrações diferentes, através da membrana especial por osmose. O seu objectivo é igualar as concentrações dos dois lados da membrana. O propósito para realizar este tratamento foi a eliminação do solvente (DMSO) que se encontrava presente nas amostras do polímero, e que se ia libertando progressivamente ao longo do processo de diálise, uma vez que é sabido que concentrações elevadas de DMSO podem levar à morte celular.

As membranas do polímero foram cortadas com a forma de discos de cerca de 10mm de diâmetro, para se adaptarem ao fundo plano das caixas de cultura de 48 poços. Para a realização destes testes foram então utilizadas caixas estéreis de poliestireno 48 poços (*Well cell Culture Cluster with flat bottom, Costar[®] Corning Incorporated 3548, NY, EUA*).

Dadas as características do estudo a desenvolver, seleccionámos, como já foi referido, fibroblastos de rato, colhidos, isolados e cultivados no IBB – FMUC. Segundo o protocolo desenvolvido e implementado no serviço, o meio de cultura usado foi o DMEM completo (Sigma-Aldrich. *St.Louis, Missouri*, Ref : D 5648, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco. Faetal Bovine Serum/ Heat inactivated Ref: 10500-064). Ao meio de cultura foram também adicionados 5ml de uma solução de penicilina (P) (10.000 U) e estreptomicina (S) (10mg/ml) (Sigma P0781) e ainda de L-glutamina (Sigma G7513), pelo que se denomina este meio de cultura completo. Todo o material utilizado na preparação

do meio de cultura, bem como todos os reagentes, estavam estéreis e foram manipulados em condições de esterilidade (*Holten LaminAir HB 2448, Labosystem, Portugal*).

Para os estudos *in vitro* é obrigatório trabalhar em condições de assepsia, por isso antes da realização do trabalho foi necessário esterilizar todo o material bem como as várias amostras dos polímeros sujeitos aos testes celulares. Começou-se pela limpeza da câmara de fluxo laminar (*Holten LaminAir HB 2448, Labosystem, Portugal*) e do aparelho de esterilização (U.V. Estéril, J.P. Selecta. S.A., watt.15, N° 251897) aspergindo-os com álcool a 75°. Depois colocou-se o aparelho no interior da câmara de fluxo e ligaram-se as lâmpadas U.V. quer do aparelho quer da câmara, com o objectivo de obter um ambiente estéril (Figura 3.9). Por fim ligou-se também a luz U.V. da sala onde permaneciam estes aparelhos.



Figura 3.9: Aparelho de esterilização U.V. no interior da câmara de fluxo laminar.

Estas condições mantiveram-se por um período de 10 horas, tempo após o qual se ligou o fluxo da câmara de fluxo laminar. Procedeu-se à introdução de 3 discos de cada polímero diferente em tubos *Falcon* de 50ml (*Corning PQ – Premium quality, Ref: 430791, México*). Estes estavam estéreis e antes de serem introduzidos na câmara foram aspergidos com álcool a 75°. De seguida, com a tampa aberta, foram inseridos no interior do aparelho de esterilização, que por sua vez estava dentro da câmara de fluxo, e colocados sob acção de U.V. por um período de 3 horas. Findo este tempo os tubos foram fechados no ambiente estéril e devidamente guardados.

No Quadro 3.2 é possível ver a disposição das várias membranas nos poços da caixa.

Quadro 3.2: Esquema representativo da disposição das membranas na caixa de 48 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B		1	1	1	2	2	2	
C		3	3	3	4	4	4	
D		5	5	5	6	6	6	
E		7	7					
F								

3.4.5.1 Realização dos testes de adesão celular

Para a realização dos testes de adesão celular foi necessário obter os fibroblastos de rato. Os animais foram adquiridos à CharlesRiver, Barcelona, tendo feito o período de quarentena no Biotério da FMUC.

Os animais envolvidos neste estudo foram sacrificados por *overdose* anestésica⁴ para se proceder à colheita de pele para isolamento dos fibroblastos. Este processo fez-se também na câmara de fluxo laminar com material esterilizado (*Holten LaminAir HB 2448, Labosystem, Portugal*).

Depois de isolados e multiplicados na caixa-mãe, com o meio de cultura atrás referido a 37°C e numa atmosfera com 5% de CO₂, os fibroblastos foram transferidos para frascos de cultura estéreis de 40ml (*Corning Flask, EUA*) em condições assépticas, juntamente com o meio de cultura atrás referido. Os frascos de cultura foram depois incubados na estufa (*Shel Lab 5% Incubator, Ref: 5215-2*) nas condições atrás referidas, para que as células pudessem aderir, crescer e multiplicar-se.

⁴ - De acordo com a legislação nacional e internacional de Bem-estar Animal.

Os testes de adesão iniciaram-se com o aquecimento do meio de cultura, que está sempre armazenado no frigorífico a 4°C, em suportes apropriados num banho de água destilada a 37°C, ao qual se adicionou um antifúngico (azida de sódio entre 1 a 5%).

Os frascos de cultura foram observados diariamente ao microscópio óptico de contraste de fase (Nikon, Elipse TS 100, Japão) acoplado a uma máquina fotográfica digital (Nikon, Coolpixe 5400, Japão). Quando as células se apresentaram confluentes, retiraram-se os frascos de cultura da estufa, aspirou-se o meio de cultura existente e substituiu-se por cerca de 3ml do meio de cultura novo, com a finalidade de descolar as células do fundo plano dos frascos.

De seguida, com um raspador estéril (*Coning Incorporated, Costar, 3010, EUA*), raspou-se o fundo do frasco onde as células cresceram. Aspirou-se este meio com células descoladas e adicionou-se cerca de 1ml de meio para lavar a caixa e arrastar as células ainda descoladas. Voltou-se a adicionar um volume de 3ml de meio para que as células que não foram descoladas continuassem a crescer e a multiplicar-se. Perfizeram-se cerca de 10ml de suspensão celular que foram colocados num tubo *Falcon* estéril de 15ml (*Corning PQ – Premium quality, 430791, México*), juntamente com 2ml que resultaram da lavagem do raspador e da caixa, para retirar as células que lhes ficaram aderentes. Centrifugou-se ligeiramente o conteúdo do tubo *Falcon*, durante 10min a 190G e a 4°C. Após centrifugação retirou-se o sobrenadante ficando apenas o *pellet*, que se ressuspendeu em meio novo para soltar um pouco mais as células, homogeneizado bem.

Recolheu-se uma alíquota da suspensão (10µl), à qual se adicionaram 10µl de Azul Tripano (Sigma-Aldrich, T 8154,EUA) num *ependorf*, para efectuar o teste de viabilidade celular, bem como a contagem das células existentes. Desta mistura retiraram-se apenas 10µl para colocar na câmara de Neubauer (profundidade 0,1mm/0,0025mm²) (*Marienfeld, Alemanha*). Os fibroblastos viáveis ficaram corados com a introdução do Azul de Tripano, o que permitiu fazer a contagem das células viáveis ao microscópio óptico invertido. No final da contagem verificámos que existiam cerca de 60 a 100x10⁴ células.

Na caixa de cultura, com a disposição referida no Quadro 3.2, colocaram-se em cada poço 250µl da suspensão celular, aos quais se juntaram os discos do polímero, de forma a ficarem completamente submersos. Todo este processo decorreu no interior da câmara de fluxo laminar, em ambiente estéril, pelo que todo o material que era introduzido na câmara

devia estar esterilizado e aspergido com álcool a 75°, como referido atrás. No final do procedimento, a caixa de 48 poços foi devidamente identificada, selada e isolada com fita-cola e introduzida na estufa a 37°C e 5% de CO₂, depois de aspergida com álcool a 75°.

O período de tempo total em que decorreram estes testes foi, em ambos os grupos, de 5 dias. Foram efectuados controlos visuais ao microscópio óptico invertido e registo fotográfico às 24, 48, 72, 96 e 110h para se certificar de que não existiria nenhuma contaminação e controlar a progressão do comportamento celular.

Cinco dias após o início do trabalho experimental retirou-se a caixa da estufa para efectuar o teste de citotoxicidade. Visualizaram-se os vários poços ao microscópio óptico de contraste de fase, e substitui-se o meio antigo por 225µl de meio novo. O restante volume dos poços até aos 250µl perfez-se com 25µL de uma concentração de 5mg/ml de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, *St.Louis, Missouri*, EUA, Ref. M2128), colocando a caixa novamente a incubar a 37°C e 5% de CO₂ cerca de 4 horas.

As células viáveis têm mitocôndrias activas que conseguem incorporar e metabolizar o MTT e transformá-lo em cristais azuis de formazan. Passado este período de tempo retirou-se esta mistura e adicionou-se exactamente o mesmo volume (250µl) de isopropanol ácido (100µl de HCl 0,04N em isopropanol), de forma rápida para evitar a sua evaporação. A finalidade desta solução é lisar as células, de modo a que as viáveis possam libertar todos os cristais azuis resultantes da metabolização do MTT. De seguida incubou-se durante cerca de 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo transferiu-se o conteúdo das caixas de 48 poços para caixas de 96 poços (*96 Well Assay Plate with flat bottom, Costar Corning Incorporated 3590, NY, EUA*), uma vez que o aparelho que permite ler os resultados do teste de citotoxicidade apenas aceita placas com 96 poços. Após esta transferência a disposição das várias membranas na placa está esquematizada no Quadro 3.3.

Quadro 3.3: Esquema representativo da disposição das membranas na caixa de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1		1		1		2		2		2
B												
C		3		3		3		4		4		4
D												
E		5		5		6		6		6		
F												
G												
H												

Decorridos os 15 minutos introduziu-se a caixa de 96 poços no aparelho de microELISA (*SLT Spectra*, Áustria) (Figura 3.10), para efectuar a sua leitura no comprimento de onda do corante azul (540nm), e com um filtro de referência a 620nm. Este ensaio dá-nos uma medida do n.º de células vivas existentes nos vários poços.



Figura 3.10: Aparelho de microELISA (*SLT Spectra*).

No final de todo o procedimento experimental, todos os poços foram inativados com lixívia e o lixo colocado em contentores específicos para lixo biológico contaminado e enviado para incineração.

3.5. Referências bibliográficas

- [1] Figura retirada de Ferreira, P., Coelho, J. F. J., Gil, M. H. (2007). Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. *International Journal of Pharmaceutics Science*. 352(1-2): 172-181.
- [2] Figura retirada de www.sigmaaldrich.com. Consultado em 21.06.08.
- [3] Adamson, J. E., Horton, C.E., Crawford, H.H., Ayers JR., W. T.(1996). The effects of dimethylsulfoxide on the experimental pedicle flap: a preliminary report. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 37: 105-110.
- [4] Nascimento, M. C. M. O, Martins, A. S. (2005). Adriamycin induced cardiomyopathy: a review. *Arquivos de Ciências da Saúde*.12 (2): 111-15.
- [5] Svingen, B. A., Powis, G., Peggy L. A., Scott M. (1981). Protection against Adriamycin-induced Skin Necrosis in the Rat by Dimethylsulfoxide and a-Tocopherol. *Cancer Research*. 41: 3395-3399.
- [6] Figura retirada de www.sigmaaldrich.com. Consultado em 15.08.2008.
- [7] Herández-Baltazar, E., Gracia-Fadrique, J. (2005) Elliptic solution to the Young-Laplace differential equation. *Journal of Colloid and Interface Science*. 287:213-216.
- [8] Kemp, R.B. *LS-L292 Cytotoxicity test*. Disponível em <http://www.ib.amwaw.edu.pl/invittox/prot/38.htm>. Consultado em 12.08.3008.

Capítulo IV

Resultados e discussão

Foi necessário encontrar uma abreviatura para referir as várias membranas de base uretana formadas. Sendo assim, a designação utilizada para a apresentação dos resultados foi a seguinte:

- 50% de modificação da molécula, com 8% de adição de Ir2959: 50%-8%;
- 50% de modificação da molécula, com 10% de adição de Ir2959: 50%-10%;
- 50% de modificação da molécula, com 12% de adição de Ir2959: 50%-12%;
- 50% de modificação da molécula, com 15% de adição de Ir2959: 50%-15%
- 75% de modificação da molécula, com 8% de adição de Ir2959: 75%-8%;
- 75% de modificação da molécula, com 10% de adição de Ir2959: 75%-10%;
- 75% de modificação da molécula, com 12% de adição de Ir2959: 75%-12%;
- 75% de modificação da molécula, com 15% de adição de Ir2959: 75%-15%.

4.1. Tempo de irradiação

Um dos objectivos deste trabalho experimental foi encontrar uma optimização possível entre o tempo de irradiação de luz ultravioleta durante a fotopolimerização, e as propriedades mecânicas das membranas formadas. Pretendiam-se membranas relativamente flexíveis, mas com resistência, e que reticulassem no menor tempo de irradiação possível. A Tabela 4.1 mostra-nos os tempos de irradiação mínimos necessários para as várias amostras preparadas em laboratório.

Tabela 4.1: Tempos de fotopolimerização mínimos para as várias amostras preparadas.

Tempo irradiação (min)	Amostras							
	50%				75%			
	8%	10%	12%	15%	8%	10%	12%	15%
4								✓
4,5				✓			✓	
5,5			✓			✓		
6	✓	✓			✓			

Analisando os dados, constatamos que existem tempos de irradiação mínimos diferentes. Este facto, relaciona-se com a quantidade de fotoiniciador presente na amostra. Quanto maior for a percentagem de Ir2959, menor será o tempo de irradiação necessário para reticular as amostras. Podemos também verificar a influência que a percentagem de modificação da molécula tem no tempo de irradiação U.V.. Para as membranas com 8% de Ir2959, o tempo de irradiação é igual, quer para 50%, quer para 75% de modificação da molécula. Para as adições de 10%, 12% e 15%, os tempos variam. Verifica-se que, quanto maior for a percentagem de modificação da molécula, maior será a facilidade em reticular a amostra, pois existem mais grupos OH a reagir.

Verificou-se também que a rigidez das membranas é tanto maior quanto maior for a percentagem de Ir2959 e quanto maior o tempo de exposição à radiação U.V.. Por sua vez a flexibilidade é tanto menor quanto menos expostas as membranas estiverem à radiação U.V.. Neste caso, optou-se apenas por um tempo de irradiação ao longo dos restantes testes efectuados (6min), sendo que este não pode ser diminuído, uma vez que as membranas com 8% de Ir2959, permaneciam líquidas e não reticuladas com tempos de exposição inferiores ao referido.

A Figura 4.1 exemplifica as reacções de modificação da agarose, bem como a respectiva reacção de reticulação.

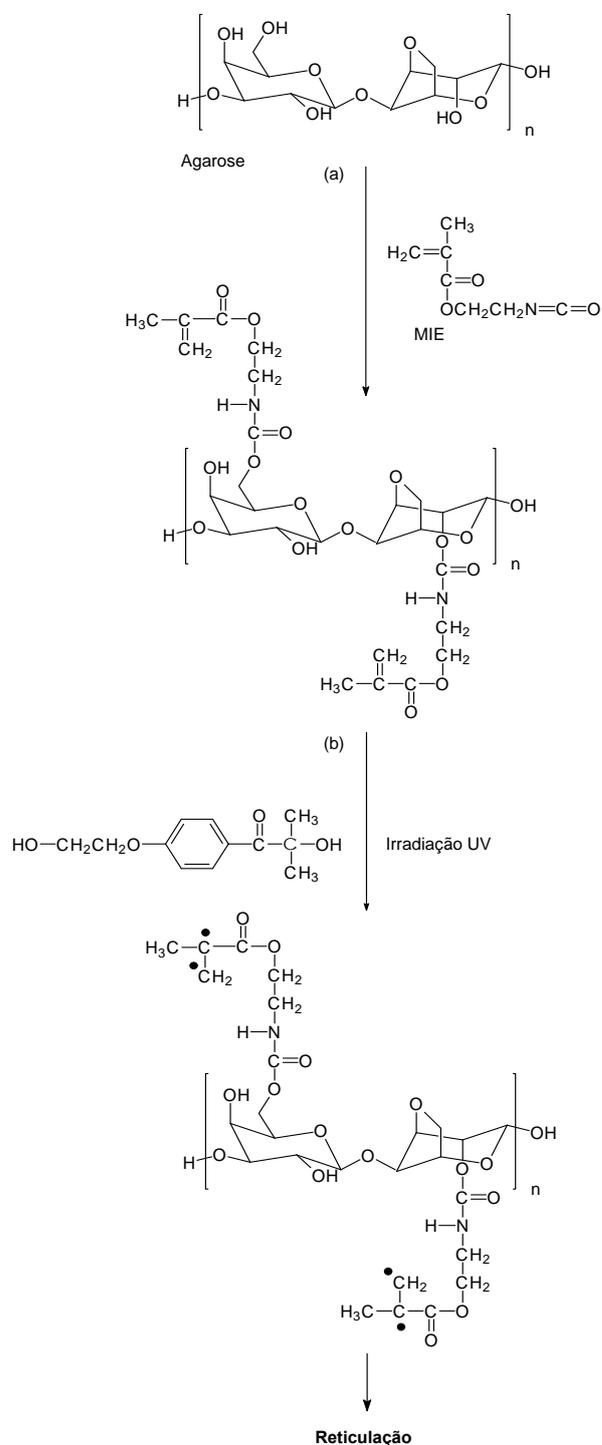


Figura 4.1: Esquema da modificação da agarose com MIE (a) e subsequente irradiação U.V. na presença do Ir2959 (b) originando matrizes reticuladas.

4.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

O presente trabalho iniciou-se com a síntese de um polímero contendo grupos uretana e grupos vinilo. A poliuretana obtida resultou da modificação da agarose com o MIE. O objectivo desta reacção foi formar um pré-polímero em estado líquido contendo ligações duplas de modo a que se pudesse reticular a agarose modificada, usando para o efeito irradiação do ultravioleta, originando o polímero final pretendido.

A presente técnica, (ATR-FTIR) tal como foi descrito no Capítulo 2, permite-nos identificar os grupos químicos presentes na amostra sujeita a análise e, desta forma, acompanhar o desenrolar da reacção. Na Figura 4.2 podemos observar o espectro resultante da análise de ATR-FTIR para a agarose antes da modificação, para o MIE e por último para a agarose modificada (agarose-MIE). Optou-se por apresentar apenas um espectro da agarose modificada, entre as duas análises realizadas (para 50% de modificação da molécula e para 75% de modificação da molécula), dado os espectros resultantes não apresentarem qualquer diferença nas bandas que apresentam.

No espectro correspondente à agarose, podemos verificar a existência de uma banda larga, de forma arredondada e pouco acentuada, que corresponde à elongação característica do grupo hidroxilo (OH) na zona dos 3332cm^{-1} .

Ao analisar o espectro do MIE, verifica-se a presença da banda de forte intensidade correspondente aos grupos isocianato ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$), na zona dos 2225cm^{-1} , e outra banda também bastante acentuada correspondente aos grupos éster ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), na zona dos 1717cm^{-1} .

No espectro da agarose modificada podemos detectar a ausência das bandas características dos grupos hidroxilo (3332cm^{-1}) e isocianato (2225cm^{-1}). Notou-se também a presença de ligações características dos grupos uretana, entre elas, a ligação $\text{C}=\text{O}$ na zona de 1715cm^{-1} , a ligação $\text{N}-\text{H}$ na zona de 3000cm^{-1} e por último, na zona dos 1525cm^{-1} , temos a banda correspondente ligação $\text{C}-\text{N}$ e à deformação da ligação $\text{N}-\text{H}$.

Pela ausência dos grupos hidroxilo e isocianato no espectro da agarose modificada, podemos afirmar que a reação ocorreu com êxito e que os grupos hidroxilo reagiram na totalidade com os grupos isocianato.

Quando se procedeu à reticulação fotoquímica do polímero anteriormente preparado, foram testadas diferentes percentagens de fotoiniciador 8%, 10%, 12% e 15% num tempo de irradiação de 6min, após o qual se formava uma membrana transparente, gelatinosa e de flexibilidade variável consoante a percentagem de Ir2959.

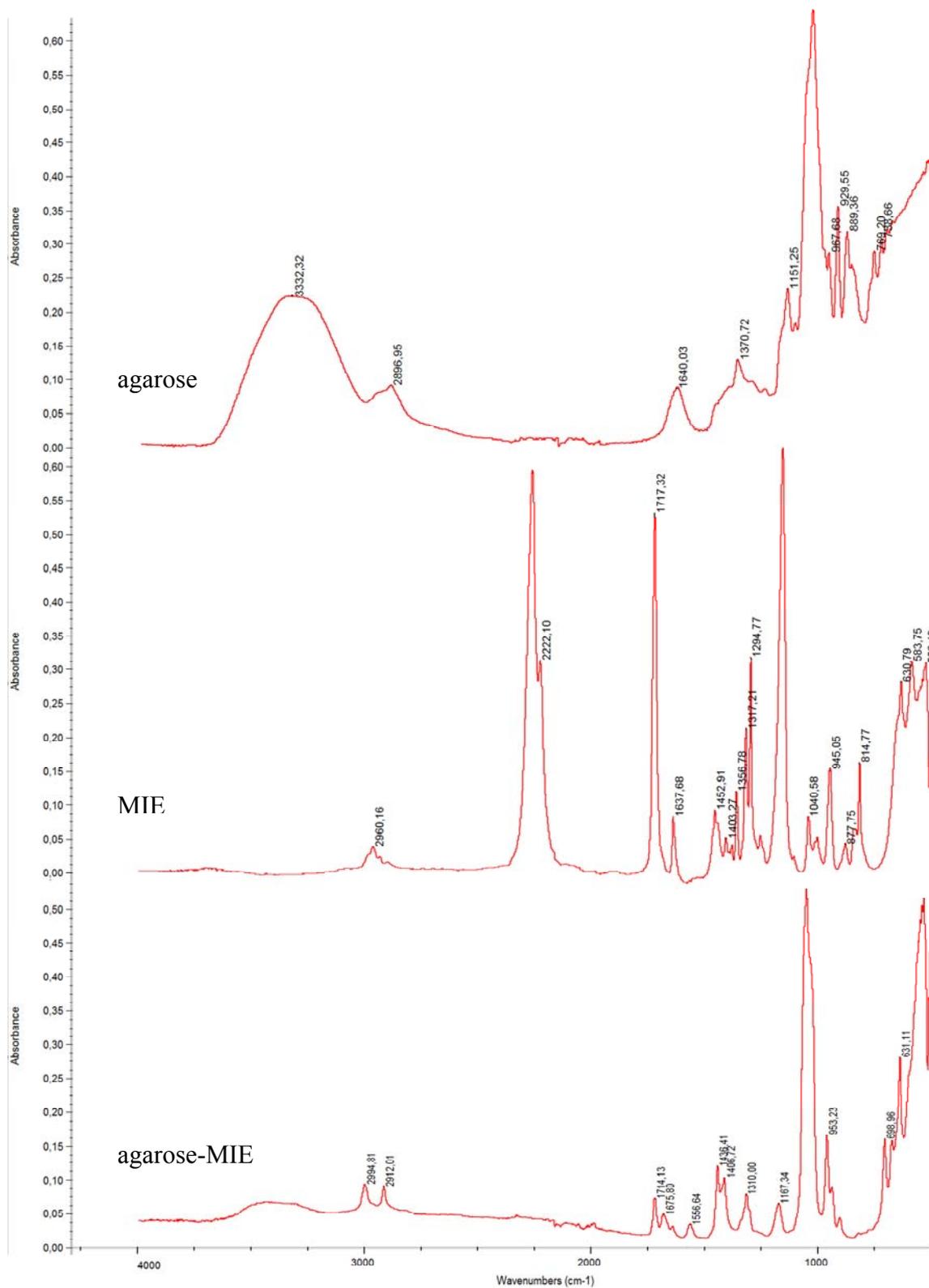


Figura 4.2: Espectros da análise ATR-FTIR para agarose, MIE e agarose modificada (agarose-MIE) (75% de modificação da molécula)

Uma vez que os espectros das várias amostras, após reticulação, são praticamente sobreponíveis, será apenas apresentado um espectro a título representativo. A Figura 4.3 diz respeito ao espectro resultante da análise de ATR-FTIR, para a membrana de 75%-15%.

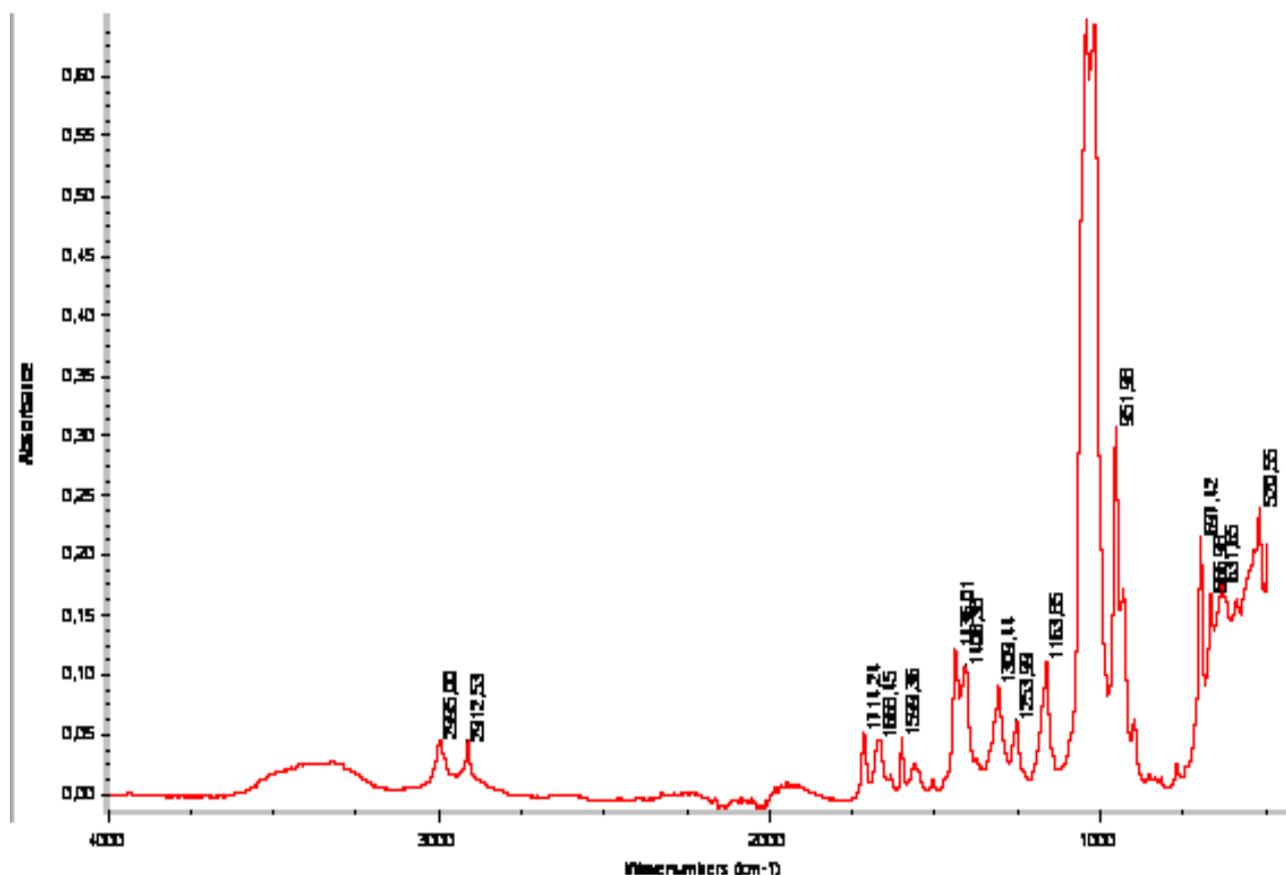


Figura 4.3: Espectro de ATR-FTIR da membrana 75%-15%.

Observando o espectro, podemos constatar que é praticamente coincidente com o espectro anteriormente apresentado da agarose modificada com MIE. Podemos assim afirmar que a adição do agente fotoiniciador não induz modificações ao nível dos grupos químicos das moléculas, apenas reticula a sua estrutura química, tornando-a mais coesa.

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

A capacidade de absorção de água foi determinada para três amostras de cada membrana preparada. Esta avaliação iniciou-se com a introdução de todas estas membranas na estufa a 60°C, durante um período de 24 horas. Passado este tempo, determinou-se o peso seco das referidas amostras. Posteriormente, estas foram introduzidas num vaso fechado que continha uma solução saturada de sulfato de cobre pentahidratado (85% de humidade relativa). As amostras foram pesadas ao longo de diferentes tempos, até se verificar uma estabilização do valor do seu peso hidratado.

Para cada amostra de cada membrana preparada, foi registado o seu peso hidratado ao longo dos vários tempos apresentados nos gráficos subsequentes. Foi calculada, também para cada amostra, a sua respectiva capacidade de absorção de água de acordo com a equação 2.3, apresentada no Capítulo 2. Uma vez que existiam três valores distintos de *swelling*, para cada tempo apresentado, correspondente às tais três amostras de cada membrana, optou-se por calcular uma média dos vários *swellings*.

Os resultados obtidos, na avaliação desta capacidade, encontram-se apresentados nas Figuras 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7.

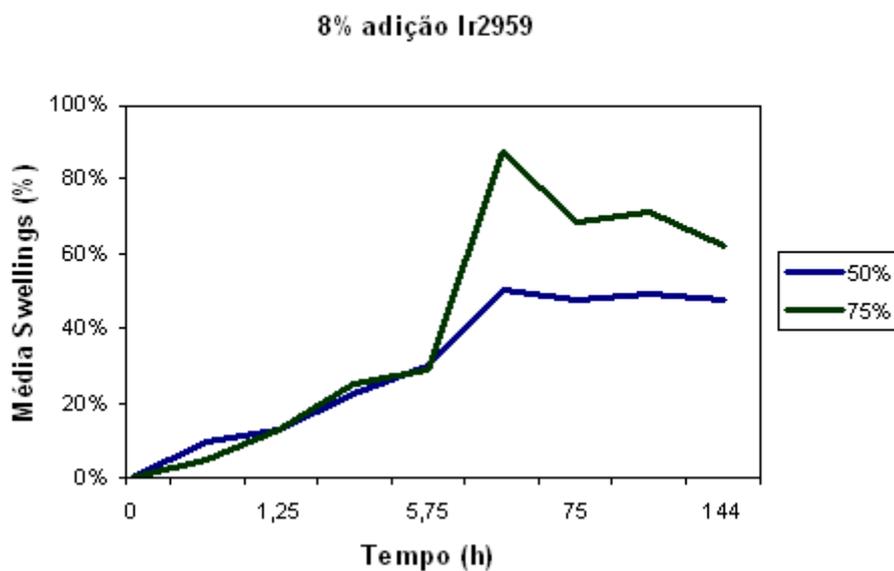


Figura 4.4: Valores da média de *swelling* para 8% de adição de Ir2959.

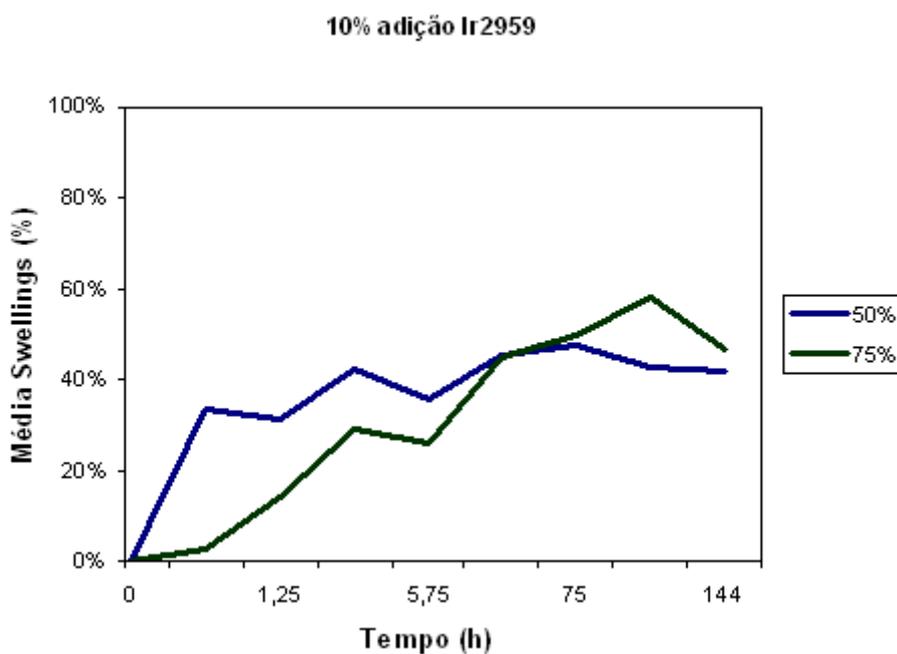


Figura 4.5: Valores da média de *swelling* para 10% de adição de Ir2959.

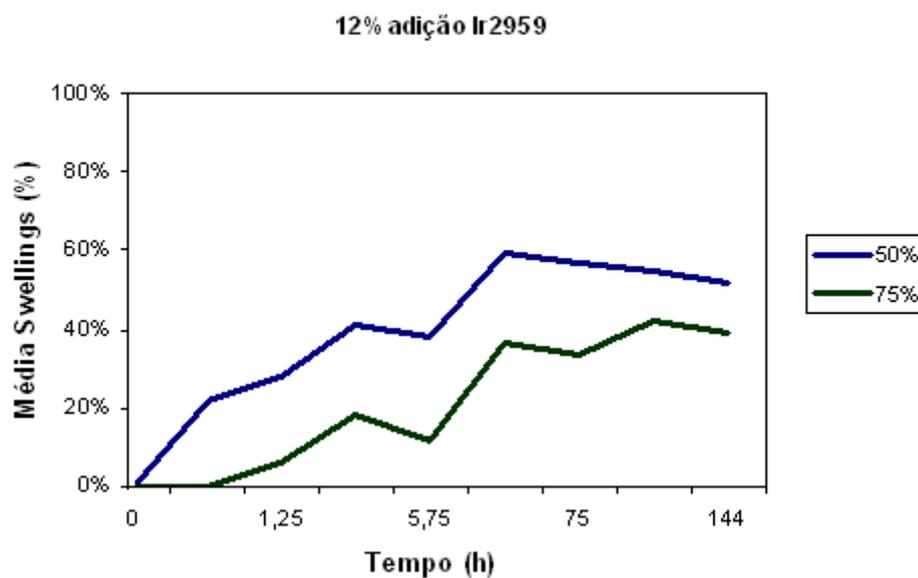


Figura 4.6: Valores da média de *swelling* para 12% de adição de Ir2959.

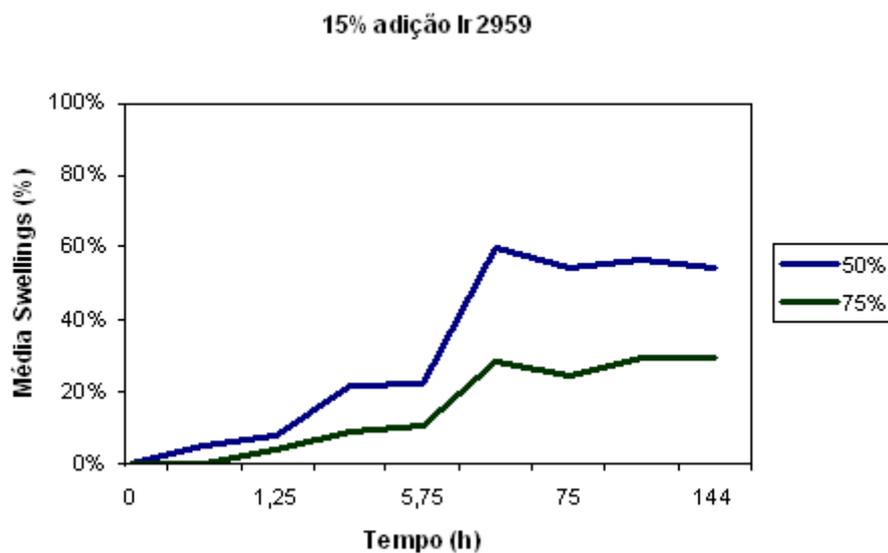


Figura 4.7: Valores da média de *swelling* para 15% de adição de Ir2959.

A apresentação dos resultados está organizada sob a forma de gráficos, que evidenciam a média dos *swellings*, das respectivas amostras testadas, no decorrer de um período de 144 horas. Cada gráfico está intitulado com a correspondente percentagem de adição do agente

fotoiniciador, (Ir2959). É possível visualizar nos gráficos a influência que as diferentes percentagens de modificação das moléculas (50% e 75% representadas a azul e verde, respectivamente), têm na capacidade de absorção de água. É também possível tirar uma elação da influência que as várias percentagens de Ir2959 adicionadas têm neste mesmo parâmetro.

Analisando os resultados verificamos que, de uma maneira geral, a capacidade de absorção de água é mais elevada para 50% de modificação molecular, do que para 75% de modificação molecular. Este dado pode ser comprovado visualizando os gráficos correspondentes às adições de 12% e 15% de Ir2959. No gráfico para 10% de adição de Ir2959, também se pode observar a mesma situação na maior parte dos tempos testados, enquanto que para 8% de adição de Ir2959, este facto já não se verifica.

Pode também afirmar-se, pela visualização dos vários gráficos, que a capacidade de absorção de água diminui com o aumento da percentagem do fotoiniciador adicionado. Este facto é mais notório para as membranas modificadas a 75%.

Para 75% de modificação molecular, existe uma considerável variação na capacidade de absorção de água; atingindo um valor máximo de 80% para 8% de Ir2959 e um valor mínimo para cerca de 20%. Para 50% de modificação molecular não existe uma variação significativa.

Estes factos, anteriormente referidos, são explicados com base no grau de reticulação da estrutura do polímero. Quanto mais reticulado for o polímero, mais rígida será a sua estrutura, menor é o espaço livre disponível, e menor a probabilidade de este ser ocupado pelo meio circundante, neste caso, por água. A estrutura das membranas é mais reticulada e menos porosa quanto maior for a modificação molecular e quanto maior for a quantidade de fotoiniciador adicionado. Uma maior reticulação implica assim uma maior hidrofobicidade, pois impede a ocupação dos espaços livres existentes por parte da água.

Pode também fazer-se referência à hidrofiliidade dos grupos hidroxílicos (OH). Uma vez que nas membranas modificadas a 75% existem menos grupos OH, a molécula torna-se por si mais hidrófoba, provocando uma diminuição da capacidade de absorção de água.

Estudos efectuados com um adesivo sintético FlolSeal[®] de base de polietilenoglicol, disponível comercialmente, sugerem que uma absorção de água por parte deste adesivo num período de 24 horas, aumenta cerca de 300% o seu volume inicial. O autor refere que

esta situação provocará uma compressão das estruturas vasculares, e que uma vez colocados perto de estruturas rígidas, estas irão ficar fortemente afectadas [1]. Tendo em conta este dado, verificamos que é útil que o adesivo revele um carácter hidrofílico, no entanto, não em demasia, para não provocar danos nas estruturas circundantes.

4.4. Testes de adesão em gelatina

Para testar a capacidade de adesão *in vitro* das várias membranas preparadas, foram utilizadas folhas de gelatina. A razão desta escolha prendeu-se com o facto da gelatina ter uma elevada constituição em grupos amínicos, tal como as proteínas presentes nos tecidos biológicos [2]. As amostras finais sujeitas aos testes tinham a representação esquematizada na Figura 2.3 do Capítulo 2.

Pretendeu-se, com este teste, verificar qual o valor de tensão associado à separação dos dois folhetos de gelatina, seja por quebra da gelatina, seja pela descolagem do polímero.

A primeira análise efectuada foi a um folheto de gelatina sem pré-polímero, apenas irradiado durante 6min pela lâmpada U.V.. Esta análise serviu para que pudessemos ter um valor que servisse de controlo.

Os resultados obtidos demonstram os valores de força no ponto de ruptura das amostras, e estão representados na Figura 4.8.

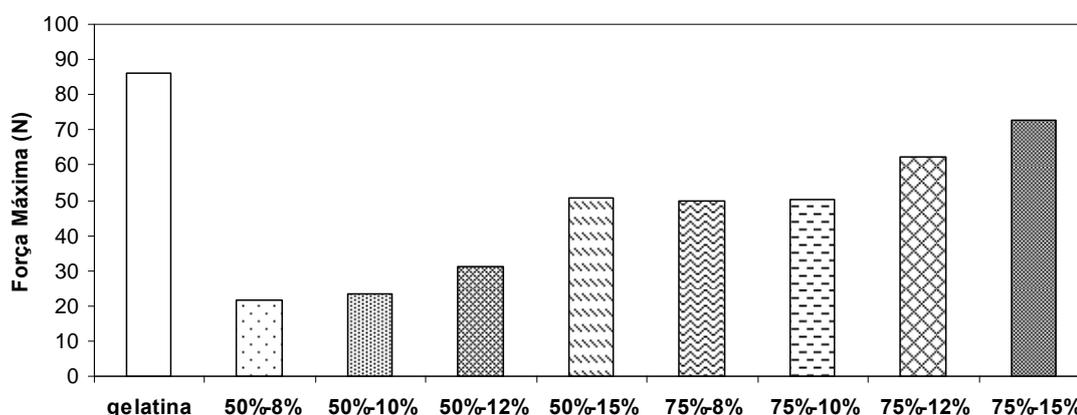


Figura 4.8: Valores de força máximos registados para cada amostra.

Pela visualização dos resultados é possível verificar que existem vários valores distintos de força de ruptura. É de referir que todos os folhetos se separaram por quebra e não por descolagem, o que já por si evidencia uma óptima capacidade adesiva dos polímeros aos folhetos de gelatina.

Observamos que o valor da máxima força corresponde à gelatina, que quebra a quase 90N. Os folhetos que continham os polímeros de 75%-15% e 75%-12%, apresentam seguidos da gelatina, valores de força de ruptura elevados, de 73N e 63N, respectivamente. Verifica-se que a modificação de 75% da molécula é a que regista valores mais elevados, em todas as suas amostras, que vão desde os 50N aos 70N. Este dado faz sentido, na medida em que a molécula com esta modificação está mais reticulada e conseqüentemente tem uma estrutura mais coesa, possibilitando uma melhor adesão aos folhetos de gelatina. Os valores de força máximos registados para 50% de modificação molecular são mais baixos, contudo têm uma maior variação, entre os 20N e os 50N. É também de assinalar que à medida que aumenta a percentagem de fotoiniciador adicionada, para cada modificação molecular, os valores de força vão sendo consecutivamente maiores. Este dado, poderá ser justificado com o grau de reticulação da molécula, que aumenta com a quantidade de Ir2959 presente no polímero. Conseqüentemente, a membrana fica menos porosa e estabelece uma ligação mais forte entre polímero e substrato.

4.5. Determinação da tensão superficial e da energia de superfície por medição dos ângulos de contacto

A determinação da tensão superficial e da energia de superfície foi determinada depois da irradiação ultravioleta e de acordo com o método da gota pendente de Laplace-Young. Para tal, efectuaram-se as medições dos ângulos de contacto estáticos para as várias membranas preparadas. Foi utilizada a relação de Owens-Wendt-Reabel e Kealble para a determinação das energias de superfície e as suas respectivas componentes polares (γ_s^p) e dispersivas (γ_s^D). Os testes foram realizados para quatro líquidos distintos: água, formamida, etilenoglicol e propilenoglicol.

Efectuaram-se 10 medições para cada membrana com energia de superfície por determinar, com cada um dos líquidos utilizado. Posteriormente o software do programa acoplado ao equipamento de medição efectuou as respectivas médias dos valores determinados.

Os resultados obtidos, bem como os valores de energia de superfície para a pele e para o sangue, encontram-se apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Valores de energia de superfície e as respectivas componentes dispersivas e polares.

Substratos	Energias de Superfície e Tensões Superficiais (mN/m)		
	γ_s	γ^D_s	γ^P_s
Gelatina	44,24	5,00	39,24
Pele	38-56	-	-
Sangue	63,80	-	-
50%-8%	67,97	1,5	66,47
50%-10%	83,50	0,14	83,36
50%-12%	42,04	10,92	31,12
50%-15%	40,51	3,99	36,51
75%-8%	53,05	1,02	52,03
75%-10%	31,48	8,97	22,51
75%-12%	36,06	8,26	27,81
75%-15%	34,73	13,53	21,20

Os valores de energia de superfície da pele e do sangue, presentes na tabela, foram já determinados por outros autores. A energia de superfície da pele varia entre os 38 e os 56mN/m, dependendo da temperatura e humidade relativa desta [3]. Para o sangue, a sua tensão superficial, à temperatura corporal de 22°C, foi determinada num valor de 63,80mN/m, num estudo efectuado em 150 pessoas saudáveis (72 do sexo masculino e 78 do sexo feminino) [4].

É necessário ter em conta que, para que um adesivo adira a um substrato, a sua energia de superfície deve ser menor ou igual à energia de superfície do aderente [3]. Se este princípio termodinâmico não estiver satisfeito, o adesivo não cumprirá com a sua função, pois provavelmente irá deslocar-se da sua posição ou perder parte da sua adesão.

Relativamente aos valores de energia de superfície apresentados pelas membranas, podemos afirmar que existem alguns valores um pouco discrepantes, nomeadamente nas membranas de 50%-8% e 50%-10%. Estes valores, uma vez que ultrapassam largamente os valores de energias de superfície de pele e do sangue, serão excluídos, por comprometerem o seu futuro desempenho como adesivo biológico.

A membrana 75%-8% apesar de ter um valor de energia de superfície ligeiramente superior ao da pele, não será excluída, uma vez que a diferença entre estes não é assim tão grande e ainda se encontrar dentro dos limites dos valores de energia de superfície da pele.

Consideramos a energia de superfície da gelatina, uma vez que irá funcionar como substrato para posteriores testes de adesão.

Foi também possível verificar que os valores das componentes polares são significativamente superiores aos valores das componentes dispersivas. Este facto significa que as forças presentes nas nossas membranas são fracas, permitindo que as forças de adesão superem as forças de coesão do polímero.

4.6. Testes de adesão celular

Os resultados obtidos a partir dos testes de determinação das energias de superfície, através da medição dos ângulos de contacto, permitem-nos excluir as membranas 50%-8% e 50%-10% dos testes de adesão celular. A razão prende-se com o facto de terem revelado energias de superfície superiores às da pele e às do sangue, o que acaba por comprometer a sua futura aplicação como adesivo biológico. Por muito que os testes biológicos destas membranas com os fibroblastos fossem vantajosos, não existiria nenhuma hipótese da sua aplicação viável nestas condições, pois o adesivo não teria capacidade para aderir ao seu substrato.

Durante a realização dos testes de adesão celular foram efectuados registos de imagens fotográficas, através de uma máquina digital, que serão apresentados de seguida.

O grupo de membranas não sujeitas ao processo de diálise, foi o primeiro a ser testado com os fibroblastos. Na Figura 4.9 e na Figura 4.10 são apresentadas algumas fotografias digitais deste primeiro teste.



Figura 4.9: Fotografias digitais de fibroblastos de rato com as membranas para 24h – a) imagem para membrana n^o 2⁴ (200 ×) e b) imagem para membrana n^o 6 (100 ×).

Na figura 4.9 a) podemos observar os aglomerados de fibroblastos. É também possível visualizar de forma nítida o contorno relativo à membrana do polímero. Na Figura 4.9 b) existe uma menor quantidade de fibroblastos, apresentando-se de forma confluyente e não sob a forma de aglomerados.



Figura 4.10: Fotografias digitais de fibroblastos de rato com membranas para 96h – a) imagem para membrana n^o 2⁵ (200 ×) e b) imagem para membrana n^o 6 (400 ×).

⁵ – De acordo com a nomenclatura numérica definida no capítulo 3.

Relacionando as Figuras 4.9 a) e b) e 4.10 a) e b) constatamos que, com o passar do tempo, não existe grande evolução da proliferação e do crescimento dos fibroblastos, com o passar do tempo.

Ao longo das observações feitas às 24, 48, 72 e 96h concluímos que não havia uma evolução positiva na adesão das referidas células a este grupo de membranas. Aquando da última observação verificámos uma elevada degradação das membranas e a existência de contaminações na grande maioria dos poços da caixa. Por conseguinte estes foram inactivados com lixívia, não se prosseguindo com os testes de viabilidade celular para estas membranas.

A razão para esta elevada degradação deveu-se aos altos níveis de DMSO que entravam na constituição das membranas. Sabe-se que este solvente é bem tolerado pelas células mas apenas para baixas concentrações. Apesar das suas propriedades biológicas importantes, quando usado em altas concentrações provoca a morte celular e induz a sua degradação [5].

O segundo grupo de membranas, sujeitas a diálise, foi colocado nos poços de uma caixa de 48 poços, de forma a ficarem totalmente submersas. Inicialmente estavam ocupados 20 poços, mas uma vez que se perdeu uma das amostras n.º 5, o volume total da caixa foi de 4,75ml (19 poços ocupados).

As Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 ilustram as fotografias digitais tiradas no decorrer dos testes efectuados. Neste caso, optou-se pela apresentação das fotografias e dos resultados de apenas três das membranas testadas. A razão desta escolha deve-se ao facto dos resultados das membranas n.º 1 serem semelhantes aos resultados das membranas n.º 2. As membranas n.º 3 e 4 estão representadas através dos resultados das membranas n.º 6, por serem também semelhantes. Os resultados das membranas n.º 5 estão presentes, por constituírem os piores resultados, e as membranas n.º 6, por apresentarem os melhores resultados.

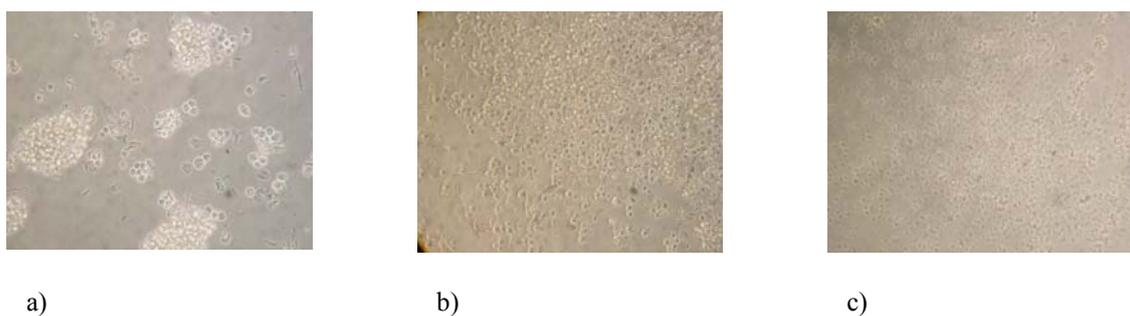


Figura 4.11: Fotografias digitais de fibroblastos de rato com a membrana n° 2 – a) imagem para 24h (100 ×), b) imagem para 72h (100 ×), c) imagem para 110h (ampliação 100 ×).

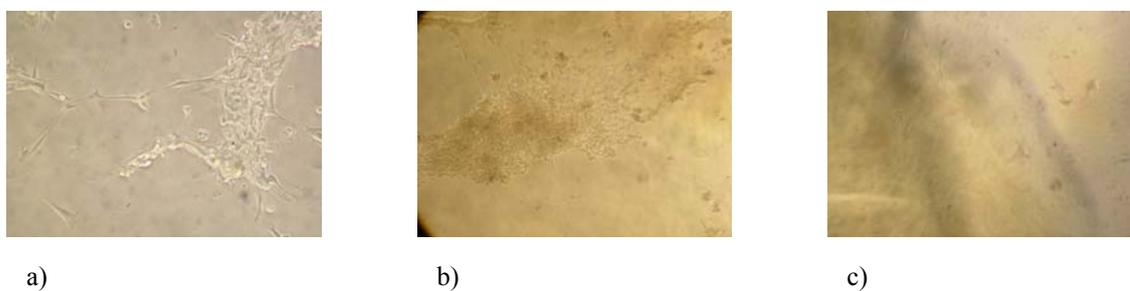


Figura 4.12: Fotografias digitais de fibroblastos de rato com a membrana n° 5 – a) imagem para 24h (200 ×), b) imagem para 72h (100 ×), c) imagem para 110h (100 ×).

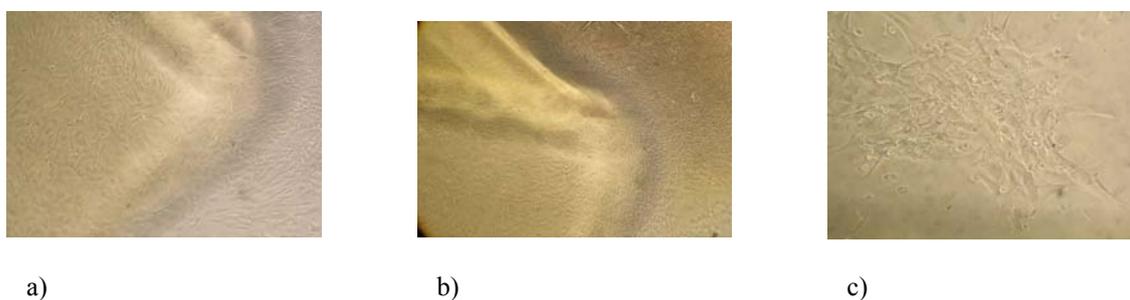


Figura 4.13: Fotografias digitais de fibroblastos de rato com a membrana n° 6 – a) imagem para 24h (100 ×), b) imagem para 72h (100 ×), c) imagem para 110h (200 ×).

Fazendo uma análise das figuras acima apresentadas, podemos verificar que em todas existe uma evolução gradual do crescimento dos fibroblastos ao longo dos vários tempos apresentados: 24, 72 e 110h.

As células escolhidas tiveram uma boa reacção com as membranas testadas, e os níveis de DMSO presentes não se revelaram tóxicos. O polissacarídeo constituinte das membranas serve de certa forma como alimento para os fibroblastos. Estes apresentam-se igualmente confluentes no fundo plano da caixa e na superfície da membrana. De referir ainda que os fibroblastos incubados com as membranas indicadas com o nº 6 apresentam maior quantidade, e um melhor desenvolvimento do que com as membranas indicadas com os nºs 5 e 2. Constatou-se que os resultados com as amostras das membranas melhoravam consoante o aumento da percentagem de adição de Ir2959 e consoante o aumento da percentagem de modificação da molécula. Desta forma, existindo menos grupos OH disponíveis, a produção de radicais livres é menor e, uma vez que estes são nocivos para o organismo, a sua existência iria desencadear reacções adversas. Estaria assim comprometido o crescimento celular.

Após a realização do teste de citotoxicidade para os fibroblastos, estes adquiriram uma tonalidade azul, devido à adição do Azul de Tripiano, como demonstrado na Figura 4.14. Como já referido o MTT é amarelo mas devido à transformação que ocorre no anel de tetrazólio do corante nas mitocôndrias das células activas ele torna-se azul (metacromasia).

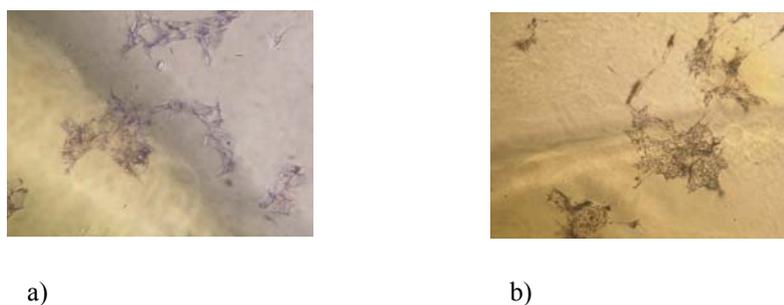


Figura 4.14: Fotografias digitais de fibroblastos de rato após adição do MTT – a) imagem da membrana nº 5 (200 ×), b) imagem da membrana nº 6 (100 ×).

A Tabela 4.3 mostra as médias dos triplicados dos valores lidos no aparelho de microELISA relativo a cada membrana.

Tabela 4.3: Valores médios de viabilidade celular (absorvância) para cada membrana.

Membranas	Absorvância (valor médio)
nº 1	0,032
nº 2	0,034
nº 3	0,057
nº 4	0,043
nº 5	0,037
nº 6	0,064

Os valores lidos no aparelho de microELISA traduzem a absorvância da cor azul, que é directamente proporcional ao número de células viáveis existentes após a incubação com cada membrana de polímero. Uma vez que se efectuaram testes em triplicado, o valor final do número de células viáveis corresponde à média dos valores para cada amostra, das respectivas membranas. Existe apenas uma excepção para as membranas nº 5, uma vez que uma das suas amostras foi perdida.

Relativamente aos valores apresentados podemos verificar que existem diferenças entre eles. No entanto não dispomos ainda de mais informações que nos possam dizer se as diferenças são significativas. Os dados não foram ainda sujeitos a tratamento estatístico, podendo apenas fazer observações qualitativas

Verificamos que existe um maior número de células viáveis para as membranas nº 6 (75%-15%), traduzindo portanto os melhores resultados. A seguir a estas, as membranas nº 4 (75%-8%) também apresentam bons resultados. Demonstrou-se ainda a semelhança existente entre os resultados das membranas nº 1 (50%-12%) e os resultados das membranas nº 2 (50%-15%), facto também confirmado pela observação da proliferação dos fibroblastos que é muito semelhante.

Pode concluir-se que, de um modo geral, as membranas modificadas a 75% apresentam melhores resultados do que as membranas modificadas a 50%. Este facto é comprovado pelos resultados do teste do MTT e pela observação das fotografias digitais.

Dadas as contingências temporais é esta a análise qualitativa que se pode efectuar de momento. Os resultados obtidos serão submetidos a tratamento estatístico no IBB-FMUC.

4.7. Referências bibliográficas

- [1] Torchiana, D. F. (2003). Polyethylene Glycol Based Synthetic Sealants: Potential Uses in Cardiac Surgery. *Journal of Cardiac Surgery*. 18(6): 504-506.
- [2] Mráz, J., Bousková, S. (1999). 2,4-toluenediisocyanate and hexamethylene-diisocyanate adducts with blood proteins: assessment of reactivity of amino acid residues in vitro. *Chemical-Biological Interactions*. 117 (2): 173-186.
- [3] Venkatraman, S., Gale, R. (1998). Skin adhesives and skin adhesion, 1. Transdermal drug delivery systems. *Biomaterials*. 19 (13): 1119-1136.
- [4] Kratochvíl, A., Hrnčíř, E. (2001). Correlation Between the Blood Surface Tension and the Activity of Some Enzymes. *Physiological Research*. 50: 433-437.
- [5] Kiselev, M.A., Lesieur, P., Kisselev, A.M., Madelmond, C., Ollivon, M. (1999). DMSO-induced dehydration of DPPC membranes studied by X-ray diffraction, small-angle neutron scattering, and calorimetry. *Journal of Alloys and Compounds*. 286: 195-202.

Capítulo V

Conclusão

Para atingir o objectivo inicialmente proposto, o desenvolvimento de um adesivo biológico, foram realizadas várias técnicas de caracterização, cujas conclusões serão seguidamente apresentadas.

Sintetizaram-se polímeros com ligações uretana, tendo por base a molécula da agarose. Fizeram-se reagir os seus grupos hidroxílicos com a molécula de metacrilato de 2-isocianoetilo, de forma a introduzir-lhe ligações duplas. A poliuretana resultante era passível de ser fotopolimerizada *in situ*, após adição do agente fotoiniciador (Ir2959) e sob condições de irradiação U.V.. Demonstrou-se assim, que o processo de reticulação decorria num tempo de 6 min.

Seguidamente testaram-se diferentes modificações da molécula da agarose, e diferentes percentagens de fotoiniciador, para determinar a influência destas variações na estrutura, na morfologia e na funcionalidade das várias membranas preparadas.

Verificou-se então que o aumento da percentagem de Ir2959 e o aumento da percentagem de modificação da molécula, conduzem à formação de membranas menos porosas e mais compactas.

O sucesso da reacção foi comprovado pela técnica de ATR-FTIR, onde se visualiza que, no espectro da agarose modificada, surgem bandas características dos grupos das ligações uretana.

Relativamente à capacidade de absorção de água, podemos concluir que esta varia consoante a quantidade de agente fotoiniciador adicionado e consoante a modificação molecular efectuada. Sendo assim, quanto maior for a quantidade de fotoiniciador, e a percentagem de modificação da molécula, menor será a sua capacidade de absorção. A membrana de 75%-8% é a que apresenta uma capacidade de absorção de água mais elevada. As membranas modificadas a 50%, também apresentam boa capacidade de absorção, não existindo grandes variações entre elas. Devemos considerar que um adesivo ideal se caracteriza por um carácter hidrofílico e poucas variações na sua capacidade de absorção de água.

Para a simulação da capacidade de adesão das membranas aos tecidos biológicos recorreu-se à fotopolimerização dos vários pré-polímeros em folhetos de gelatina. É de referir a boa capacidade adesiva deste polímero, uma vez que na realização dos testes de

tracção, a sua ruptura ocorreu por quebra e não por descolagem. Os melhores resultados surgem para as membranas de 75%-12% e 75%-15%, possivelmente devido à coesão da sua estrutura.

No que diz respeito às energias de superfície calculadas para as várias membranas reticuladas, podemos afirmar que quase todos os valores determinados se revelam inferiores aos valores apresentados para a gelatina, para a pele e para o sangue. Desta forma, podemos afirmar que a adesão entre o polímero irá acontecer quer com a pele, quer com o sangue, e que ocorrerá proximidade intermolecular entre o adesivo e o seu substrato. As excepções ocorrem para as membranas de 50%-8% e de 50%-10%.

No que concerne aos testes de adesão celular, tivemos alguma dificuldade em conseguir resultados satisfatórios. O solvente utilizado na preparação do pré-polímero, quando usado em elevadas concentrações, como foi o caso, provoca a morte celular. Desta forma recorreu-se ao processo de diálise para eliminar a presença do DMSO, sem no entanto poder quantificar qual a percentagem desta eliminação. Com este tratamento prévio, conseguimos impedir a morte celular e assegurar a continuidade dos testes. Uma vez que os resultados provenientes da leitura do aparelho de microELISA aguardam tratamento estatístico, as conclusões que podemos retirar resultam apenas de observações, e por conseguinte sem nenhum conhecimento da sua significância. Ao longo dos testes *in vitro*, foi possível verificar que as membranas são biocompatíveis, por não se detectarem sinais de contaminações ou fungos. Os melhores resultados verificam-se para as membranas de 75%-15%, já que apresentam um maior número de células viáveis.

Conclui-se por fim que o material apresentou várias potencialidades para aplicação como adesivo biológico.

Trabalho Futuro

Considerando que, para o desenvolvimento deste projecto o tempo se revelou bastante restrito, haverá vários aspectos que futuramente devem ser equacionados.

Seria de grande interesse tentar introduzir outro solvente na preparação do pré-polímero. Desta forma evitar-se-ia recorrer ao processo de diálise, uma vez que existe a grande dificuldade em saber qual o tempo óptimo para a realização deste processo. Este factor é de grande importância pois se o processo for feito em pouco tempo, corre-se o risco de ainda permanecerem elevados níveis de DMSO nas membranas e consequentemente afectar todo o trabalho seguinte; se o processo decorrer num grande período de tempo, a estrutura das membranas começa a tornar-se demasiado rígida e ao perder flexibilidade, torna-se mais complicado o seu manuseamento.

Uma redução do tempo necessário ao estabelecimento de adesão seria igualmente útil, no sentido de se conseguir uma aplicação mais rápida.

A continuidade do trabalho de adesão celular, desta vez com fibroblastos humanos, poderia facultar novos dados para o conhecimento e caracterização das membranas.

O estudo da biodegradação em plasma humano, bem como a experimentação *in vivo*, foram etapas consideradas neste projecto, no entanto tornaram-se inviáveis pela falta de tempo.

Finalmente, convém referir que em qualquer dos materiais preparados, existe a possibilidade de incorporar moléculas com fármacos, quer sejam anti-inflamatórios ou analgésicos. Actualmente, existem já estudos com estas mesmas membranas, no sentido de avaliar a sua potencialidade como sistemas de libertação controlada de fármacos.

