

## **Produção de filmes e peças 3D de materiais híbridos biocompatíveis com potenciais propriedades antimicrobianas**

Inês Monte Vinha Ferreira Amaral

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Biomédica

### Orientadores

Professora Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa (ISEL)

Professor Doutor Ivo Manuel Ferreira de Bragança (ISEL)

### Júri

Presidente: Professor Doutor Manuel José de Matos

Vogais: Professor Doutor Tiago Daniel Adriano  
Fernandes  
Professora Doutora Ana Catarina Cardoso de  
Sousa

Dezembro de 2022



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Ana Catarina Sousa, por toda ajuda e disponibilidade demonstradas ao longo da realização deste trabalho. Por todo o conhecimento partilhado e toda a paciência demonstrada ao longo destes meses.

Ao meu orientador Professor Doutor Ivo Bragança pela ajuda e disponibilidade ao longo da realização deste projeto.

À Professora Doutora Sónia Martins, do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, pelo apoio na realização dos ensaios microbiológicos.

Ao Professor Doutor Jorge Duarte pelo apoio na aplicação dos modelos matemáticos da cinética de libertação.

Agradeço ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa e Área Departamental de Engenharia Química pela realização do trabalho experimental no Laboratório de Química Inorgânica, ao Centro de Química Estrutural, do Instituto Superior Técnico, por disponibilizar o acesso aos equipamentos de FTIR-ATR e à Área Departamental de Tecnologia Mecânica e Gestão Industrial, do Instituto Superior Técnico, por disponibilizar o acesso ao equipamento de ensaios de tração. Agradeço também ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo apoio financeiro através do projeto IPL/2021/Naf4Med3D\_ISEL.

Um agradecimento muito grande à Mariana Patornilo por ter sido o maior apoio no laboratório na realização deste trabalho. Por toda a paciência, pela amizade e por todos os momentos de alegria neste percurso.

Agradeço a todos os outros colegas de laboratório que proporcionaram um excelente ambiente todos os dias e que me apoiaram na realização deste trabalho. À Rafaela Cabral por toda a disponibilidade e por toda a paciência quando pedia explicações na parte química. Ao Hugo Lapa e ao Luís Correia por todo o apoio, pelos incentivos e sobretudo pela amizade ao longo destes meses.

Um agradecimento muito especial à Carla Ferreira e à Filipa Rosa, os meus pilares ao longo destes 2 anos. Obrigado por todo o apoio, pela amizade, pela motivação e pelo encorajamento nos momentos mais difíceis. Sem vocês não teria conseguido completar esta etapa.

Por último, mas sempre os primeiros, agradeço à minha família porque sem ela tudo isto seria impossível. Um agradecimento muito especial aos meus pais que tornaram este objetivo uma realidade, por todo o apoio e toda a compreensão e motivação ao longo deste caminho (eu sei que não foi fácil lidar comigo). Um grande obrigado à minha irmã, a pessoa que atura com todas as minhas dúvidas e dificuldades e que me apoia sempre.

Muito obrigada a todos.



## Resumo

A resistência a antimicrobianos é atualmente um dos maiores problemas de saúde pública, sendo necessárias ações que visem combater esta ameaça global. Face a este problema, cada vez mais os compostos derivados de produtos naturais têm sido utilizados como agentes antimicrobianos no desenvolvimento de novos tratamentos para microrganismos resistentes. Face às melhorias tecnológicas os materiais híbridos têm sido altamente investigados, uma vez que as suas características promissoras os tornam adequados a diversas aplicações na área da biomédica, podendo ser utilizados como base para novos produtos com propriedades antimicrobianas. O uso de polímeros naturais, que atuam como bases na produção de filmes ou como misturas para a impressão 3D apresenta diversas vantagens de onde se destaca a biocompatibilidade. Adicionalmente estes materiais provêm de fontes renováveis que os tornam muito atrativos em termos de custos e vantagens ambientais.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de filmes e peças 3D, fabricados com matrizes poliméricas com base no óleo de soja incorporados com compostos naturais (cinamaldeído, eugenol, o-vanilina e álcool vanílico) a fim de produzir materiais biocompatíveis, com possíveis propriedades antimicrobianas. Outro objetivo foi estudar o perfil de libertação dos compostos dos filmes produzidos. Foram avaliadas as características físico-químicas e mecânicas dos filmes incorporados, através da análise de FTIR-ATR, absorção de água e ensaios de tração. De modo a avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos selecionados e dos filmes produzidos foi utilizada a técnica de sobreposição de *soft-agar*, onde foram utilizadas duas estirpes de bactérias, a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*.

Na generalidade, os materiais produzidos revelaram-se mais eficazes contra a *Staphylococcus aureus* e os filmes de resina OSEA mostraram-se os mais promissores. Relativamente aos compostos ativos, a incorporação de cinamaldeído apresentou-se como a mais eficiente para a inibição do crescimento bacteriano.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, Materiais híbridos, Compostos naturais, Resina de soja, Impressão 3D.

## Abstract

Antimicrobial resistance is currently one of the biggest concerns regarding public health so there is a crescent need to act against this global threat. Nowadays, more compounds derived from natural products have been used as antimicrobial agents in the development of new treatments against resistant microorganisms. Given technological improvements, hybrid materials have been highly investigated due to their promising characteristics for biomedical applications and can be used as a base for new antimicrobial products. The use of natural polymers, which serve as bases in producing films or mixtures for 3D printing, presents several advantages, especially biocompatibility. Additionally, these materials come from renewable sources making them very attractive in terms of cost and environmental needs.

In this context, one of the present work's goals was to produce films and 3D objects, manufactured with soybean-based resins incorporated with natural compounds (cinnamaldehyde, eugenol, *o*-vanillin and vanillic alcohol) to produce biocompatible materials with possible antimicrobial properties. Another goal was to study the release model of the compounds dopped in the films. Physicochemical and mechanical properties were determined through FTIR-ATR spectroscopy, water absorption and tensile tests. Furthermore, the antimicrobial activity was investigated, by the Agar diffusion test, against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Generally, the produced materials were more effective against *Staphylococcus aureus* and the AESO films proved to be the most promising. Regarding the active compounds, the incorporation of cinnamaldehyde was the most efficient in inhibiting bacterial growth.

**Keywords:** Antimicrobial activity, Hybrid materials, Natural Compounds, Soybean-based resins, 3D printing.



## Lista de Abreviaturas

<b>ATR</b>	Refletância total atenuada ( <i>Attenuated Total Reflection</i> )
<b>AV</b>	Álcool Vanílico
<b>CAD</b>	Desenho assistido por computador ( <i>Computer-Aided Design</i> )
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colônias ( <i>Colony Forming Units</i> )
<b>CIN</b>	Cinamaldeído
<b>DIC</b>	<i>Digital Image Correlation</i>
<b>DLP</b>	Processo de Luz Digital ( <i>Digital light processing</i> )
<b>EUG</b>	Eugenol
<b>FA</b>	Fabrico aditivo
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Infrared spectroscopy</i> )
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b>GRAS</b>	Geralmente reconhecido como seguro ( <i>Generally Recognised as Safe</i> )
<b>MHA</b>	Meio <i>Mueller-Hinton agar</i>
<b>MHB</b>	Meio <i>Mueller-Hinton broth</i>
<b>MHS</b>	Meio <i>Mueller-Hinton soft</i>
<b>OE</b>	Óleos essenciais
<b>OSEA</b>	Óleo de soja epoxidado acrilado
<b>OV</b>	<i>o</i> -vanilina
<b>RAM</b>	Resistência a antimicrobianos
<b>SLA</b>	Estereolitografia ( <i>Stereolithography</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta

**UV-vis**      Ultravioleta-visível

**3D**          Tridimensional

# Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas .....	xv
1.Introdução .....	1
1.1. Resistência a Antimicrobianos .....	2
1.2. Sistemas de libertação controlada .....	4
1.3. Modelos de libertação controlada .....	6
1.4. Materiais híbridos para sistemas de libertação controlada.....	8
1.5. Resinas .....	9
1.5.1. Shellac.....	10
1.6. Impressão 3D .....	12
1.6.1. Estereolitografia e Processamento Digital de Luz .....	14
1.7. Produtos naturais .....	15
1.7.1. Cinamaldeído.....	18
1.7.2. Eugenol .....	19
1.7.3. Vanilina .....	20
2. Materiais e Métodos .....	23
2.1. Reagentes.....	23
2.1.1. Produção de filmes e peças 3D .....	23
2.1.2. Ensaio microbiológicos.....	25
2.2. Preparação dos filmes .....	25
2.2.1. Produção dos filmes de resina Anycubic® .....	25
2.2.2. Produção dos filmes de resina Anycubic® e shellac .....	26

2.2.3.	Produção dos filmes de resina OSEA .....	26
2.3.	Produção de peças 3D .....	27
2.4.	Ensaio microbiológicos .....	27
2.5.	Ensaio de absorção de água .....	28
2.6.	Espectrofotometria Ultravioleta-Visível .....	28
2.6.1.	Ensaio de libertação controlada .....	29
2.7.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier com Reflexão Total Atenuada .....	29
2.8.	Ensaio de tração .....	30
3.	Resultados e Discussão .....	32
3.1.	Preparação e caracterização de filmes antimicrobianos .....	32
3.1.1.	Filmes de resina Anycubic®.....	33
3.1.2.	Filmes de resina Anycubic® e shellac.....	34
3.1.3.	Filmes de resina OSEA.....	34
3.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes .....	35
3.2.1.	Filmes de controlo e compostos isolados.....	36
3.2.2.	Filmes de resina Anycubic®.....	39
3.2.3.	Filmes de resina Anycubic® e shellac.....	40
3.2.4.	Filmes de resina OSEA.....	42
3.2.5.	Análise comparativa dos resultados dos ensaios antimicrobianos .....	44
3.3.	Análise de FTIR-ATR.....	45
3.4.	Ensaio de Libertação Controlada .....	47
3.4.1.	Filmes de resina Anycubic®.....	47
3.4.2.	Filmes de resina Anycubic® e shellac.....	49
3.4.3.	Filmes de resina OSEA.....	50
3.4.4.	Análise conjunta dos resultados de libertação .....	51
3.4.5.	Estudos da cinética de libertação.....	52
3.5.	Ensaio de tração .....	55

3.5.1. Resistência à tração e extensão máxima.....	55
3.5.2. Módulo de <i>Young</i> .....	59
3.6. Ensaio de absorção de água .....	61
3.7. Produção de peças 3D .....	63
3.7.1. Peças 3D de resina Anycubic®.....	63
3.7.2. Peças 3D de resina OSEA.....	66
4. Conclusões e Perspetivas Futuras .....	68
5. Referências Bibliográficas .....	72
Anexos.....	80
Anexo 1. Espectros de FTIR-ATR das amostras de resina Anycubic® incorporados com EUG, OV e AV. ....	80
Anexo 2. Espectros de FTIR-ATR das amostras de resina Anycubic® e shellac incorporados com EUG, OV e AV.....	81
Anexo 3. Espectros de FTIR-ATR das amostras de resina OSEA incorporados com EUG, OV e AV.....	82

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Bólus típico de <b>(A)</b> um sistema de libertação convencional e <b>(B)</b> um sistema de libertação controlada. Adaptado <sup>16</sup> .....	5
<b>Figura 2</b> – Síntese da resina OSEA. Adaptado <sup>34</sup> .....	10
<b>Figura 3</b> – Estrutura química típica do shellac. <b>A</b> – Ácido aleurítico; <b>B</b> – Ácido terpeno cíclico. Adaptado <sup>36</sup> .....	11
<b>Figura 4</b> – Esquema do princípio de funcionamento da impressão por SLA e DLP. Adaptado <sup>42</sup> .....	15
<b>Figura 5</b> – Proposta do mecanismo de ação antibacteriana dos OE <sup>54</sup> .....	18
<b>Figura 6</b> – Estrutura molecular do cinamaldeído.....	18
<b>Figura 7</b> – Estrutura molecular do eugenol.....	19
<b>Figura 8</b> – Estrutura molecular da vanilina.....	20
<b>Figura 9</b> – Estrutura molecular da <i>o</i> -vanilina <b>(A)</b> e do álcool vanílico <b>(B)</b> .....	21
<b>Figura 10</b> – Possível estrutura química da resina Anycubic®.....	24
<b>Figura 11</b> – <b>A</b> – Peça de auxílio para o corte de amostras; <b>B</b> – Ensaio de tração de um filme de resina Anycubic® e shellac.....	30
<b>Figura 12</b> – Provetes utilizados <b>(A)</b> e ensaio com utilização do sistema DIC <b>(B)</b> .....	31
<b>Figura 13</b> – Filmes de resina Anycubic®; <b>A)</b> RI; <b>B)</b> RI-EUG; <b>C)</b> RI-CIN; <b>D)</b> RI-OV; <b>E)</b> RI-AV.....	33
<b>Figura 14</b> – Filmes de resina Anycubic® e shellac; <b>A)</b> RS; <b>B)</b> RS-EUG; <b>C)</b> RS-CIN; <b>D)</b> RS-OV; <b>E)</b> RS-AV.....	34
<b>Figura 15</b> – Filmes de resina OSEA; <b>A)</b> OSEA; <b>B)</b> OSEA-EUG; <b>C)</b> OSEA-CIN; <b>D)</b> OSEA-OV; <b>E)</b> OSEA-AV.....	35
<b>Figura 16</b> – Estrutura molecular da gentamicina.....	36
<b>Figura 17</b> – Imagens dos testes de difusão dos compostos; <b>A)</b> e <b>E)</b> EUG; <b>B)</b> e <b>F)</b> CIN; <b>C)</b> e <b>G)</b> OV; <b>D)</b> e <b>H)</b> AV.....	36
<b>Figura 18</b> – Gráfico representativo do halo de inibição dos compostos contra a <i>E.coli</i> e a <i>S.aureus</i> .....	37
<b>Figura 19</b> – Imagens dos testes de difusão dos filmes controlo negativo; <b>A)</b> e <b>D)</b> RI; <b>B)</b> e <b>E)</b> RS; <b>C)</b> e <b>F)</b> OSEA.....	38
<b>Figura 20</b> – Imagens dos testes de difusão dos filmes controlo positivo; <b>A)</b> e <b>D)</b> RI-GEN; <b>B)</b> e <b>E)</b> RS-GEN; <b>C)</b> e <b>F)</b> OSEA-GEN.....	38
<b>Figura 21</b> – Gráfico representativo do halo de inibição dos filmes de controlo positivo contra a <i>E.coli</i> e a <i>S.aureus</i> .....	39

<b>Figura 22</b> – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina Anycubic dopados; <b>A) e E) RI-EUG; B) e F) RI-CIN; C) e G) RI-OV; D) e H) RI-AV</b> .....	40
<b>Figura 23</b> – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina Anycubic® e shellac dopados; <b>A) e E) RS-EUG; B) e F) RS-CIN; C) e G) RS-OV; D) e H) RS-AV</b> .....	41
<b>Figura 24</b> – Imagens dos testes de difusão dos filmes dopados de resina Anycubic® e shellac; <b>A) e E) RS-7,5CIN; B) e F) RS-5CIN; C) e G) RS-2,5CIN; D) e H) RS-1CIN</b> .....	42
<b>Figura 25</b> – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina OSEA dopados; <b>A) e E) OSEA-EUG; B) e F) OSEA-CIN; C) e G) OSEA-OV; D) e H) OSEA-AV</b> .....	42
<b>Figura 26</b> – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina OSEA dopados; <b>A) e E) OSEA-7,5CIN; B) e F) OSEA-5CIN; C) e G) OSEA-2,5CIN; D) e H) OSEA-1CIN</b> .....	43
<b>Figura 27</b> – Gráfico representativo do halo de inibição dos filmes híbridos contra a <i>E.coli</i> ( <b>A</b> ) e a <i>S.aureus</i> ( <b>B</b> ). .....	44
<b>Figura 28</b> – Espectros FTIR-ATR dos filmes de resina Anycubic®, resina Anycubic® e shellac e resina OSEA, incorporados com CIN.....	46
<b>Figura 29</b> – Espectros de UV-vis (em etanol) dos compostos utilizados; <b>A) EUG</b> ( $2,4 \times 10^{-4}$ mol/L); <b>B) CIN</b> ( $3,9 \times 10^{-5}$ mol/L); <b>C) OV</b> ( $6 \times 10^{-5}$ mol/L); <b>D) AV</b> ( $2 \times 10^{-4}$ mol/L).....	47
<b>Figura 30</b> – Perfis de libertação dos filmes RI-EUG, RI-CIN, RI-OV e RI-AV, em função do tempo.....	48
<b>Figura 31</b> – Perfis de libertação dos filmes RS-EUG, RS-CIN, RS-OV e RS-AV, em função do tempo.....	49
<b>Figura 32</b> – Perfis de libertação dos filmes OSEA-EUG, OSEA-CIN, OSEA-OV e OSEA-AV, em função do tempo. ....	50
<b>Figura 33</b> – Gráficos tensão-extensão do filme RI ( <b>A</b> ) e do filme OSEA ( <b>B</b> ); Pontos da resistência máxima à tração ( <b>C</b> e <b>D</b> ).....	55
<b>Figura 34</b> – Gráfico representativo dos resultados obtidos nos ensaios de resistência à tração dos filmes de resina Anycubic®; <b>A) Resistência à tração máxima; B) Extensão máxima</b> . ....	56
<b>Figura 35</b> – Gráfico representativo dos resultados obtidos nos ensaios de resistência à tração dos filmes de resina Anycubic® e shellac; <b>A) Resistência à tração máxima; B) Extensão máxima</b> .....	57
<b>Figura 36</b> – Gráfico representativo dos resultados obtidos nos ensaios de resistência à tração dos filmes de resina OSEA; <b>A) Resistência à tração máxima; B) Extensão máxima</b> . ....	58
<b>Figura 37</b> – Gráfico representativo das curvas tensão-extensão do filme RS-EUG, com e sem o sistema DIC. ....	59

<b>Figura 38</b> – Módulo de <i>Young</i> dos filmes de resina Anycubic <b>(A)</b> , resina Anycubic® e shellac <b>(B)</b> e resina OSEA <b>(C)</b> .....	61
<b>Figura 39</b> – Taxa de absorção de água dos filmes de resina Anycubic <b>(A)</b> , resina Anycubic® e shellac <b>(B)</b> e resina OSEA <b>(C)</b> , após 24h. ....	62
<b>Figura 40</b> – Peças 3D de resina Anycubic®; <b>A)</b> Peça 1; <b>B)</b> PRI-CIN; <b>C)</b> PRI-EUG; <b>D)</b> PRI-AV; <b>E)</b> PRI-OV. ....	65
<b>Figura 41</b> – Peças 3D de resina Anycubic®; <b>A)</b> Peça 1; <b>B)</b> POSEA-CIN; <b>C)</b> POSEA-EUG; <b>D)</b> POSEA-AV. ....	66

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Interpretação dos mecanismos de libertação por difusão de filmes poliméricos <sup>20</sup> .....	7
<b>Tabela 2</b> – Características da resina Anycubic® <sup>69</sup> .....	23
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros da resina Anycubic® <sup>69</sup> .....	24
<b>Tabela 4</b> – Filmes poliméricos produzidos.....	32
<b>Tabela 5</b> – Filmes poliméricos produzidos com diferentes quantidades de CIN. ....	33
<b>Tabela 6</b> – Resultados de libertação, em etanol, dos diferentes filmes híbridos, após 4 h e 24 h de ensaio.....	51
<b>Tabela 7</b> – Valores obtidos do estudo cinético de libertação dos filmes .....	53
<b>Tabela 8</b> – Parâmetros para impressão de peças 3D de resina Anycubic® <sup>69</sup> .....	63
<b>Tabela 9</b> – Dimensões das peças 3D .....	63
<b>Tabela 10</b> – Códigos das peças 3D produzidas .....	64
<b>Tabela 11</b> – Dimensões das peças 3D de resina Anycubic® dopadas com os compostos em estudo. ....	65
<b>Tabela 12</b> – Dimensões das peças 3D de resina OSEA dopadas com os compostos em estudo. ....	67



## 1.Introdução

A resistência a antimicrobianos (RAM), que acontece quando ocorrem alterações nos microrganismos de modo que os fármacos que os combatem se tornem menos eficazes, apresenta-se como uma das maiores ameaças à saúde pública do século XXI. Dada a importância desta resistência, a Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu planos de ação de modo a implementar o uso racional de agentes antimicrobianos e para estabelecer redes de vigilância desta resistência a nível laboratorial<sup>1-2</sup>.

Tendo em consideração estes fatores, a descoberta de novos antibióticos é essencial para o tratamento de microrganismos resistentes. Os produtos naturais são uma das maiores fontes de novas moléculas farmacológicas e por esse motivo muitos investigadores têm focado a sua atenção no estudo de extratos de plantas, microrganismos e óleos essenciais como potenciais agentes antimicrobianos<sup>3</sup>.

Face às melhorias tecnológicas na área dos materiais, os materiais híbridos ou compósitos têm sido altamente investigados, uma vez que as suas características promissoras os tornam adequados a diversas aplicações em diferentes áreas, incluindo a área da biomédica. Os materiais híbridos de base polimérica são frequentemente usados, nesta área da saúde, para a fabricação de sistemas de libertação controlada de fármacos<sup>4-5</sup>. Apresentam diversas vantagens relativamente aos sistemas de entrega convencionais que incluem libertação controlada de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos em doses constantes por longos períodos de tempo no local de ação pretendido, o aumento da segurança e eficácia dos fármacos e ainda o aumento da adesão dos pacientes ao tratamento<sup>6</sup>.

A impressão tridimensional (3D) tem vindo a tornar-se uma das tecnologias mais inovadoras, poderosas e revolucionárias na área dos cuidados de saúde, devido às suas vantagens únicas, tais como a liberdade ilimitada de criação de desenhos em 3D e a capacidade de produção de objetos multifuncionais e económicos com estruturas altamente delicadas e complexas, num curto período de tempo<sup>7-8</sup>.

A implementação da impressão 3D é extremamente útil no desenvolvimento de terapias individualizadas, tendo esta técnica sido utilizada em diversos sistemas de entrega de fármacos, nomeadamente sistemas de libertação controlada oral, microchips, implantes, entre outros<sup>9</sup>. Existem várias técnicas de impressão 3D, sendo a estereolitografia uma das técnicas mais poderosas e versáteis atualmente. Esta é uma técnica que utiliza a fotopolimerização de resinas líquidas para fabricar o objeto pretendido. Estas resinas podem ser feitas à base de polímeros de óleos vegetais que não só exibem uma excelente

biocompatibilidade como também uma baixa toxicidade eliminando os riscos associado ao uso de resinas à base de petróleo<sup>10</sup>.

## 1.1. Resistência a Antimicrobianos

A RAM é definida como a capacidade de os microrganismos sobreviverem e manterem-se viáveis sob a influência de agentes antimicrobianos. Existem vários tipos de agentes antimicrobianos tais como os antibióticos, desinfetantes e conservantes alimentares que podem ser usados de forma a reduzir a capacidade de crescimento dos microrganismos, inibir a sua multiplicação e provocar a sua morte<sup>11</sup>.

Os agentes antimicrobianos podem ser naturais, semissintéticos ou sintéticos e cada um deles apresenta diferentes mecanismos que são capazes de provocar grandes alterações nos microrganismos, tanto a nível metabólico como a nível fisiológico. Estas alterações incluem modificações na síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, inibição da via metabólica e interferência com a replicação e tradução do DNA<sup>11</sup>.

A RAM é um problema de saúde pública à escala mundial<sup>12</sup>. Estima-se que 700 mil mortes são atribuídas à RAM, anualmente, e que este número possa subir para 10 milhões até 2050. Adicionalmente, as infeções causadas por microrganismos patogénicos resistentes a antibióticos são normalmente mais difíceis de tratar resultando em tempos de hospitalização mais prolongados, apresentando ainda uma maior tendência para recidivas, aumentando significativamente o fardo económico nos sistemas nacionais de saúde<sup>13</sup>.

Devido à ameaça global crescente deste problema, é necessário perceber a base genética da resistência bacteriana<sup>14</sup>. A resistência a antibióticos exibida pelas bactérias pode ser classificada em 3 categorias distintas: intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca refere-se à resistência exibida devido às propriedades inerentes da bactéria. A resistência adquirida manifesta-se quando uma bactéria previamente sensível adquire um mecanismo de resistência por uma de duas formas: por uma mutação ou pela obtenção de novo material genético de uma fonte exógena. Por fim, existe ainda a resistência adaptativa que ocorre quando a resistência a um ou vários antibióticos é induzida por um sinal ambiental, como por exemplo, pH, condições nutricionais, entre outros. Esta é uma resistência transitória, sendo possivelmente o resultado de mudanças epigenéticas e não genéticas que normalmente resultam em fenótipos permanentes<sup>13</sup>.

Para além da base genética da RAM, de modo a determinar as estratégias terapêuticas adequadas é necessário conhecer mecanismos de resistência específicos. Existem essencialmente 4 tipos de mecanismos de resistência, que incluem:

- Diminuição da acumulação do fármaco por diminuição da permeabilidade da membrana exterior ou aumento do fluxo ativo dos fármacos ao longo da superfície da célula.
- Inativação ou modificação do fármaco através da produção de enzimas que alteram ou destroem o antibiótico, tornando-o ineficaz.
- Alteração de locais de ligação ou ação tais como por exemplo a alteração de proteínas de ligação à penicilina ou de proteínas de ligação aos ribossomas.
- Alteração das vias metabólicas<sup>14</sup>.

Atualmente, pode-se verificar o rápido aparecimento da RAM à escala mundial e o seu alastramento de país para país mais rápido do que esperado previamente. As superbactérias e bactérias multirresistentes são endémicas em diversas partes do globo. O uso excessivo e o mau uso dos antimicrobianos, nomeadamente dos antibióticos, tanto no ser humano como na agricultura, criação animal e na indústria, são a principal causa deste alastramento exponencial da RAM<sup>13-14</sup>. É notável que desde a introdução dos antibióticos na prática clínica, o desenvolvimento de novos antibióticos nunca consegue estar a par do aparecimento da resistência. Sendo por este motivo que a principal via para diminuir a mesma é promover o uso correto dos antibióticos, especialmente nos cuidados de saúde. No entanto, existem outras áreas onde os antimicrobianos são utilizados em grandes quantidades, nomeadamente na indústria agrícola, que não só contribui para o desenvolvimento de RAM, como também atua como uma ligação à cadeia de transmissão de genes de resistência que se disseminam pelas águas do subsolo e pela ingestão humana<sup>14</sup>.

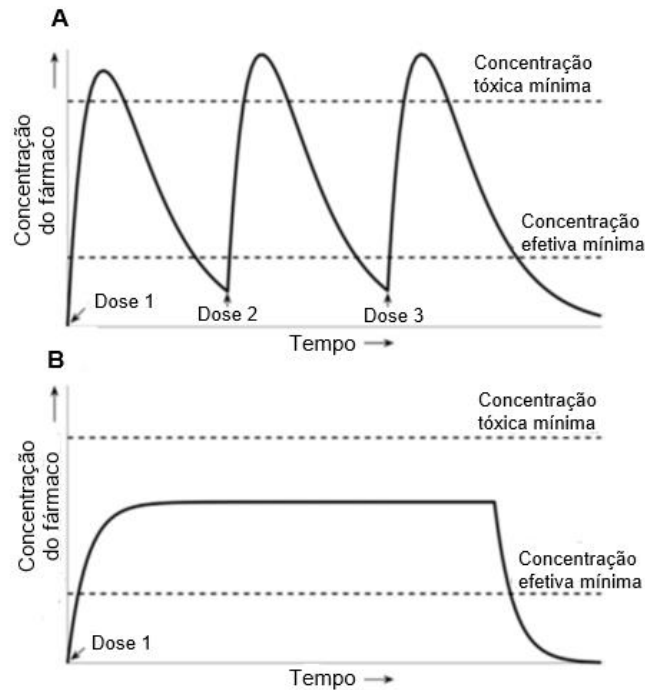
Tendo em consideração estes fatores, a descoberta de novos antibióticos é essencial para o tratamento de microrganismos resistentes ou prevenção da sua proliferação. Os produtos naturais são uma das maiores fontes de novas moléculas farmacológicas, visto que produtos derivados de microrganismos e plantas constituem a maioria dos compostos antimicrobianos descobertos até hoje. As plantas e outros recursos naturais podem fornecer uma variedade muito grande de compostos complexos e estruturalmente diversos. Por estes motivos, vários investigadores têm focado a sua atenção no estudo de extratos de plantas, microrganismos e óleos essenciais como potenciais agentes antimicrobianos<sup>3</sup>.

## 1.2. Sistemas de liberação controlada

Um sistema de liberação de fármacos é definido como uma formulação ou um dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica no corpo melhorando a sua eficácia e segurança através do controlo do tempo, local e taxa de liberação das substâncias no organismo. Este processo inclui a administração do produto terapêutico, a liberação das substâncias ativas pelo mesmo e o subsequente transporte destas substâncias pelas membranas biológicas para o local de ação<sup>15</sup>.

Os sistemas de liberação de fármacos convencionais, tais como comprimidos, cápsulas e xaropes, são muito rapidamente eliminados do organismo e a dose não é bem mantida na janela terapêutica. Após a toma de uma única dose convencional, o fármaco é metabolizado rapidamente aumentando o seu nível sérico, seguido imediatamente por um decréscimo exponencial. Este intervalo de tempo pode não ser suficiente para induzir um efeito terapêutico significativo resultando numa resposta sub-terapêutica. Verifica-se, assim, a necessidade de encontrar abordagens que sejam capazes de manter a concentração do fármaco no plasma superior à concentração efetiva mínima, mas inferior à concentração tóxica. Abordagens como a administração de doses múltiplas em intervalos regulares e administração de uma dose única maior do que a dose necessária apresentam diversas desvantagens que incluem a flutuação dos níveis de fármaco no plasma, aumento dos efeitos adversos e a fraca adesão dos pacientes<sup>16</sup>.

Surgem então os sistemas de liberação controlada, que após a administração de uma única dose mantêm os níveis de fármacos no plasma constantes, dentro dos valores da janela terapêutica, proporcionando o efeito terapêutico desejado durante um período mais prolongado. Na Figura 1, estão representadas as curvas farmacocinéticas da concentração do fármaco no plasma ao longo do tempo, onde se podem observar as diferenças entre estes dois tipos de sistemas<sup>16</sup>.



**Figura 1** – Bólus típico de **(A)** um sistema de libertação convencional e **(B)** um sistema de libertação controlada. Adaptado<sup>16</sup>.

Atualmente, existem muitas exigências para o desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos modificados que permitam a redução da frequência de dosagem e o aumento da eficiência do fármaco de modo a diminuir a ocorrência de efeitos secundários. Com esse objetivo, têm sido efetuados avanços consideráveis no desenvolvimento de diferentes sistemas de libertação controlada com base em polímeros orgânicos<sup>6</sup>. Os polímeros apresentam características que possibilitam o desenvolvimento destes tipos de sistemas, tais como as propriedades mecânicas ajustáveis, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade. São, por definição, moléculas compostas pela repetição de monómeros, sendo a base de alguns dos mais fundamentais materiais do dia-a-dia. Os polímeros podem ainda ser sintéticos, naturais, hidrofóbicos, hidrofílicos, termoplásticos ou termoendurecíveis. Podem também ser ajustados de modo a terem propriedades físicas e químicas desejáveis incluindo o peso molecular, elasticidade, carga da superfície e polaridade<sup>17</sup>.

Todas as propriedades inerentes aos polímeros permitem que estes tenham vindo a desempenhar um papel fundamental nesta tecnologia permitindo a libertação controlada de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos em doses constantes por longos períodos de tempo no local de ação pretendido<sup>6,18</sup>. Outras vantagens inerentes ao uso dos polímeros incluem o

aumento da segurança e eficácia dos fármacos e ainda o aumento da adesão dos pacientes ao tratamento<sup>6</sup>.

Os sistemas de libertação controlada com base em polímeros podem ser categorizados em 3 tipos de sistemas distintos: sistemas de difusão controlada, sistemas ativados por solventes e sistemas controlados quimicamente (biodegradáveis).

- Sistemas de difusão controlada, nos quais o fármaco é dissolvido ou disperso, dependendo na solubilidade e concentração do fármaco no polímero, numa matriz não intumescível ou intumescível mas que não se degrade durante a vida terapêutica<sup>6,18</sup>.
- Sistemas ativados por solventes, onde os fármacos são incorporados em hidrogéis. Quando estes sistemas são expostos a um ambiente aquoso, o hidrogel absorve a água levando ao aumento do seu volume e libertando o fármaco<sup>4,18</sup>.
- Sistemas biodegradáveis, em que a libertação do fármaco é obtida através da degradação do polímero. Nestes sistemas a hidratação gradual da estrutura polimérica pode causar a degradação hidrolítica que leva à libertação do seu conteúdo, sendo que a degradação vai depender da estabilidade das ligações das cadeias poliméricas nos fluidos corporais<sup>18-19</sup>.

### 1.3. Modelos de libertação controlada

Quando um composto bioativo se encontra envolvido por um filme ou membrana polimérica ou disperso uniformemente numa matriz hidrofílica, a sua libertação resulta da interação entre a dissolução, a difusão e os mecanismos de erosão<sup>20</sup>. Existem diferentes modelos cinéticos que representam os mecanismos de libertação.

A cinética de libertação de ordem zero, ocorre quando os compostos ativos estão envoltos em matrizes que praticamente não se desagregam resultado numa libertação constante, geralmente lenta, e ocorre de uma forma linear com o tempo, representada pela equação:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

Em que  $Q_0$  representa a quantidade inicial de composto ativo dissolvido na solução (normalmente zero),  $Q_t$  a quantidade de composto ativo dissolvido no tempo  $t$  e  $K_0$ , a constante de libertação de ordem zero<sup>20-21</sup>.

No caso da cinética de libertação de primeira ordem, esta ocorre quando as substâncias ativas são hidrossolúveis e se encontram incorporadas em matrizes porosas. Neste caso a libertação do composto ocorre geralmente de uma forma proporcional à quantidade restante no seu interior, conduzindo a que a quantidade de substância ativa libertada diminua com o tempo. O perfil desta libertação é traduzido pela equação:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303}$$

Onde  $Q_t$  é quantidade de composto ativo libertado no tempo  $t$ ,  $Q_0$  é a quantidade inicial de composto ativo e  $K_1$  é a constante de libertação de primeira ordem. O gráfico da quantidade libertada do composto ativo em função do tempo, será linear<sup>20-22</sup>.

Quando o modelo de libertação não é conhecido ou quando este resulta de dois processos: 1) a libertação do composto bioativo obedece às leis de Fick (difusão) e 2) fenómenos de intumescimento da matriz polimérica, por imersão em fluídos, promovem a libertação do composto ativo (transporte caso II), o modelo matemático genericamente utilizado para analisar a libertação de compostos bioativos em materiais hidrofílicos, baseia-se na equação semi-empírica proposta por *Korsmeyer e Peppas*.

$$F = \frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

Onde  $F$  representa a fração de composto ativo libertado segundo o tempo  $t$ , em horas,  $M_t$  a quantidade de composto ativo libertado no tempo  $t$ , em horas,  $M_\infty$  a quantidade total do composto ativo inserido na amostra,  $K$  a constante de cinética. O valor  $n$ , denominado de expoente de difusão ou libertação é utilizado para caracterizar diferentes mecanismos de libertação, como se encontra descrito na Tabela 1<sup>20,21</sup>.

**Tabela 1** – Interpretação dos mecanismos de libertação por difusão de filmes poliméricos<sup>20</sup>.

Expoente de libertação (n)	Mecanismo de transporte	Taxa em função do tempo
$n < 0,5$	Difusão Quase-Fickiana	$t^n$
0,5	Difusão Fickiana	$t^{0,5}$
$0,5 < n < 1,0$	Anómalo (transporte não-Fickiano)	$t^{n-1}$
1,0	Transporte de caso II	Independente do tempo
Superior a 1,0	Transporte super caso II	$t^{n-1}$

## **1.4. Materiais híbridos para sistemas de liberação controlada**

Um material híbrido é formado pela junção de dois ou mais materiais que possuem propriedades físicas e químicas significativamente diferentes quando combinados, levando à produção de um material com propriedades superiores aos materiais constituintes isolados<sup>5,23</sup>. Existem diferentes tipos de matrizes utilizadas para o desenvolvimento destes materiais, entre elas as matrizes poliméricas.

Os materiais híbridos de base polimérica são frequentemente usados para a fabricação de sistemas de liberação controlada de fármacos. A aplicação de materiais poliméricos para fins medicinais tem vindo a crescer de forma exponencial, uma vez que os polímeros estão incluídos em diversas áreas da biomedicina. Adicionalmente aos sistemas de liberação controlada de fármacos, estes são utilizados na engenharia de tecidos, dispositivos médicos, próteses, oftalmologia, reparação de ossos, entre outros.

Os polímeros têm sido utilizados na formulação de formas de dosagem sólidas, líquidas e semissólidas e são particularmente úteis no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos modificados<sup>4</sup>. Os materiais poliméricos biodegradáveis podem ser categorizados em dois grandes grupos consoante o tipo de polímero utilizado, como naturais ou sintéticos.

Os polímeros de origem sintética apresentam vantagens relativamente aos polímeros naturais devido à sua versatilidade que lhes permite apresentar um largo espectro de aplicações, tendo a capacidade de alteração das suas propriedades mecânicas e de alterar a taxa de degradação, de acordo com as necessidades<sup>24</sup>. Polímeros sintéticos como os poliuretanos e os poliésteres apresentam excelentes aplicações no campo da biomédica, nomeadamente no tratamento de feridas, dispositivos ortopédicos, aplicações dentárias e cardiovasculares e engenharia de tecidos.

Os polímeros naturais, tais como o colagénio, apresentam algumas limitações nomeadamente instabilidade e imunogenicidade<sup>25</sup>. No entanto, o uso deste tipo de polímeros em aplicações farmacêuticas é bastante atrativo, pois estes são económicos, rapidamente disponíveis, não tóxicos, capazes de realizar modificações químicas, potencialmente biodegradáveis e biocompatíveis<sup>4,24</sup>.

## 1.5. Resinas

O termo resina originalmente era aplicado a produtos naturais de baixo peso molecular, que eram normalmente definidos como materiais com uma coloração amarelada a castanha, transparentes a opacos, facilmente fundidos e não cristalizáveis, solúveis na maioria dos solventes orgânicos e insolúveis em água. Com o desenvolvimento da indústria química, este termo foi também aplicado a materiais sintéticos que são usados como substitutos para resinas naturais ou para materiais com propriedades físicas semelhantes.

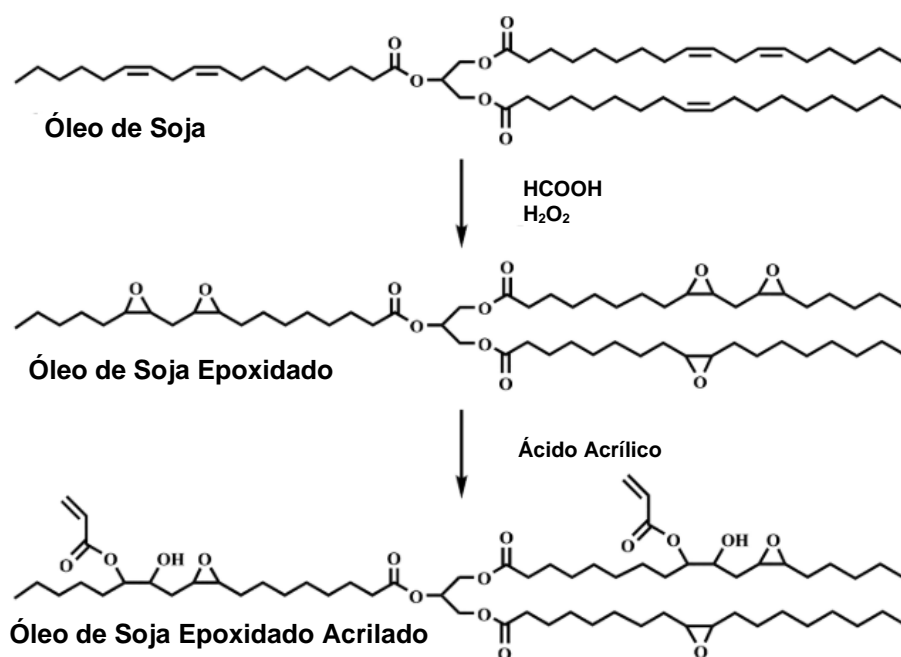
As resinas são produtos com uma massa molecular média, não excedendo os 10000 g/mol e sendo que na maioria dos casos esta é menor. Apresentam uma estrutura amorfa e complexa, não exibindo um elevado ponto de fusão. As resinas podem ser divididas em naturais e sintéticas<sup>26</sup>. As resinas naturais são produtos insolúveis em água, exsudados por árvores, plantas e animais. A maioria das resinas naturais provém das plantas, sendo o *shellac* a única resina de origem animal. A composição destas resinas é complexa, contendo diversos compostos, maioritariamente ácidos carboxílicos, óleos essenciais e hidrocarbonetos. Apresentam-se como um líquido viscoso que se torna sólido através da evaporação dos seus componentes mais voláteis e pela oxidação ou polimerização parcial dos percussores insaturados. Estas resinas são utilizadas nos vernizes, tintas de impressão, adesivos e composições poliméricas<sup>27-29</sup>. As resinas sintéticas resultam de reações químicas controladas tais como a poliadição e policondensação entre reagentes bem definidos que não apresentam características de resinas<sup>26</sup>.

As resinas à base de petróleo, constituem 65% do volume de resinas usadas por ano em todo o mundo. No entanto a utilização deste tipo de resinas leva à poluição do ar e apresenta riscos para saúde uma vez que possuem químicos tóxicos a serem libertados das mesmas. Devido à crescente preocupação ambiental e redução das reservas de petróleo, os investigadores têm tentado substituir estas resinas de petróleo por resinas sustentáveis e “amigas do ambiente” de base biológica. As biomassas utilizadas incluem proteínas vegetais, carboidratos, óleos vegetais, entre outros<sup>27-28</sup>.

Os óleos vegetais são os mais utilizados como matéria-prima para a produção de resinas naturais devido à sua abundância, baixa toxicidade, biodegradabilidade e às estruturas de triglicéridos que são adequadas para a preparação de vários constituintes de resinas para cura por ultra-violeta (UV)<sup>29-30</sup>. O óleo de soja e seus derivados têm sido utilizados como substitutos ideais dos compostos à base de petróleo, sendo a matéria-prima mais utilizada nas resinas de base vegetal<sup>30,34</sup>. Especialmente, o seu derivado Óleo de Soja Epoxidado Acrilado (OSEA) tem sido diversamente aplicado em resinas para cura por UV devido aos seus grupos facilmente polimerizáveis. O OSEA é sintetizado através de uma

reação de abertura de anéis entre o óleo de soja epoxidado e o ácido acrílico, como está representado na Figura 2<sup>32,34</sup>.

Atualmente tem-se verificado um crescente uso destas resinas de base biológica renováveis na impressão 3D, mais precisamente em técnicas que utilizam a fotoquímica no desenvolvimento dos objetos 3D<sup>35</sup>. As resinas fotossensíveis líquidas são geralmente compostas por monómeros líquidos, oligómeros e fotoiniciadores. Várias resinas de base biológica são utilizadas em algumas modalidades de impressão 3D, incluindo polímeros derivados da celulose, acrilatos para cura por UV baseados em fenólicos naturais e acrilatos baseados em óleos vegetais<sup>35</sup>.

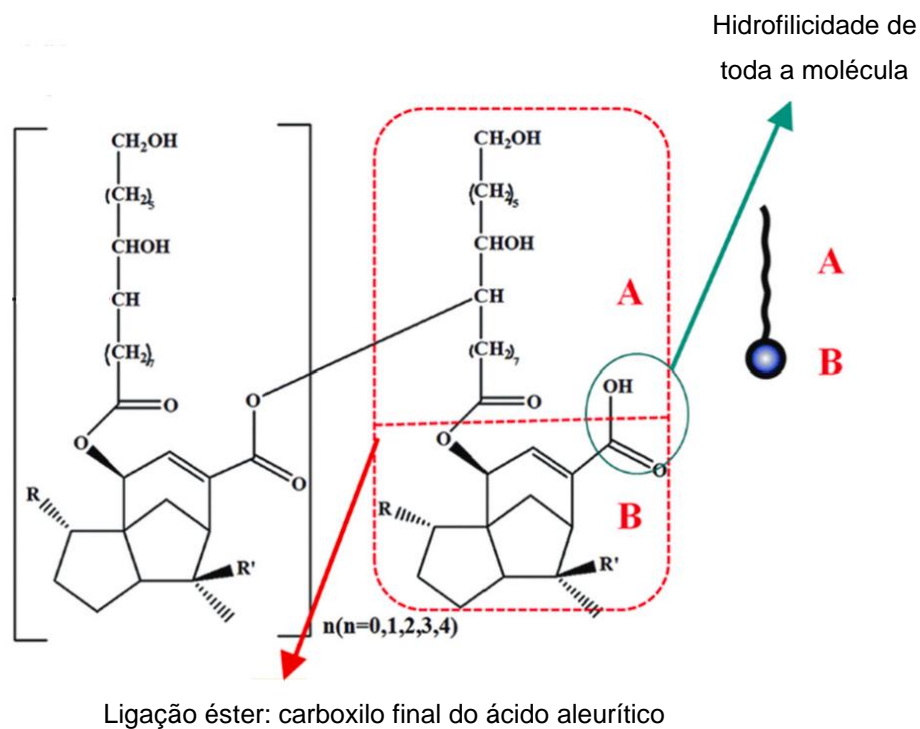


**Figura 2** – Síntese da resina OSEA. Adaptado<sup>34</sup>.

### 1.5.1. Shellac

O shellac é um polímero natural refinado a partir de uma resina excretada pelo inseto, *Laccifer lacca*, que é um parasita em certas árvores, localizadas especialmente na Índia, Birmânia, Tailândia e no sul da China<sup>36</sup>. A União Europeia permitiu o seu uso como um aditivo alimentar e apresenta ainda o estatuto de molécula geralmente reconhecida como segura (GRAS) pela FDA, nos Estados Unidos da América<sup>33-34</sup>.

O shellac é uma resina de baixo peso molecular, maioritariamente composta por poliésteres oxiácidos. Os oxiácidos estão divididos em ácidos aleuríticos e ácidos terpenos cíclicos unidos por ligações éster, constituindo, respetivamente, os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos desta resina. Na sua estrutura molecular, apresenta ainda grupos carboxilo, levando a que o shellac apresente uma baixa acidez e que se dissolva em soluções alcalinas. Esta resina é caracterizada pela sua resposta ao pH, excelente anfifilicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, compatibilidade celular e não toxicidade<sup>33-34</sup>. Uma unidade típica de shellac apresenta 5 grupos hidroxilo completos, um grupo carboxilo livre, 3 grupos éster, um único grupo aldeído parcialmente escondido e uma insaturação com uma ligação dupla num local, sendo que estes grupos funcionais são ligados quimicamente por ligações éster, acilal, acetal e éter<sup>37</sup> (Figura 3).



**Figura 3** – Estrutura química típica do shellac. **A** – Ácido aleurítico; **B** – Ácido terpeno cíclico. Adaptado<sup>36</sup>.

Devido às suas excepcionais propriedades, o shellac tem sido utilizado em diversas áreas. Desde o início do século XXI, devido à necessidade crescente de produtos naturais, o espectro de aplicações desta resina aumentou significativamente, especialmente no campo da eletrónica “verde”, impressão 3D, sensores inteligentes, na indústria alimentar e farmacêutica<sup>37</sup>.

Nas últimas décadas, o shellac tem também sido utilizado para desenvolver sistemas de libertação devido às suas diversas vantagens previamente mencionadas. Os sistemas de libertação com base no shellac têm sido muito estudados, demonstrando o seu grande potencial de aplicação tanto na área alimentar como na área da medicina. Comprimidos e filmes contendo substâncias ativas que têm por base uma matriz de shellac podem controlar a libertação destas substâncias ativas através do ajuste dos parâmetros de preparação tendo em consideração os locais de ação e as propriedades do fármaco<sup>38</sup>.

## 1.6. Impressão 3D

O conceito de impressão 3D teve como pioneiro *Pierre A. L. Ciraude*, na década de 70, ao descrever um método de solidificação camada a camada de um material em pó, pela ação de um raio de alta energia. Na década de 80, *Carl Deckard* desenvolveu um método de solidificação de pós utilizando um raio laser, denominada de sinterização seletiva a laser (SLS). Nesta mesma década, *Chuck Hull* criou a Estereolitografia (SLA), a primeira tecnologia de impressão 3D comercializável<sup>39</sup>.

A impressão 3D é um processo de fabrico aditivo (FA) para a criação de objetos, a partir da adição camada a camada de um determinado material selecionado<sup>8</sup>. Atualmente existem diversos métodos de impressão 3D, tendo sido desenvolvidos variando a fonte de energia, o material utilizado e características mecânicas<sup>9</sup>. Os materiais utilizados são variados e incluem, entre outros, metais, polímeros, polímeros compósitos e cerâmicos<sup>8</sup>. Entre os diversos métodos de impressão, os mais proeminentes e que são utilizados na área médica incluem SLA, SLS, impressão *inkjet*, extrusão, modelagem por deposição fundida e bioimpressão<sup>7,40</sup>.

Apesar da diversidade de métodos inerentes a este tipo de impressão, a preparação do objeto 3D inclui vários passos comuns a todos eles. Inicialmente é feito o desenho do objeto com recurso a um *software* de modelação, geralmente designado de CAD (*Computer-Aided Design*), seguida da otimização da geometria de acordo com as especificações da impressora. Após o design do objeto, é feita a exportação do modelo 3D para um formato de ficheiro reconhecido pela impressora. De seguida, é feita a importação do ficheiro para o *software* da impressora, onde são geradas as diferentes camadas que vão ser impressas, sendo que o peso das camadas impressas influencia essencialmente a qualidade do objeto e o tempo de impressão. Por último procede-se à fabricação do objeto 3D com a aplicação das camadas de material específico a cada método de impressão<sup>39</sup>.

A impressão 3D tem vindo a tornar-se uma das tecnologias mais inovadoras na área dos cuidados de saúde. O aumento da necessidade de produtos farmacêuticos e

dispositivos médicos personalizados aliado à constante evolução tecnológica levou a um aumento exponencial da MA, na última década, em diversas áreas da saúde<sup>39,40</sup>. Esta técnica é considerada uma das ferramentas mais poderosas e revolucionárias na tecnologia da manufatura precisa devido às suas vantagens únicas, tais como a liberdade ilimitada de criação de desenhos em 3D, contribuindo para a produção de produtos personalizados, e a capacidade de produção de objetos multifuncionais e económicos com estruturas altamente delicadas e complexas, num curto período de tempo<sup>7-8</sup>. Todas estas características levaram à aplicação desta técnica na engenharia e em várias áreas não médicas, incluindo as indústrias automóvel, aeroespacial e de consumo de bens. No entanto, outras vantagens como o rápido desenvolvimento dos métodos de impressão, prototipagem rápida, minimização do desperdício, aparecimento de materiais biocompatíveis versáteis e de ser uma técnica “amiga do ambiente”, têm vindo a facilitar a aplicação da tecnologia de impressão 3D na área farmacêutica<sup>7,9</sup>.

A necessidade do desenvolvimento de uma medicina personalizada racionalizando o uso de fármacos pelos diferentes pacientes nas doses corretas tem sido um tópico de discussão, uma vez que a natureza heterogénea das doenças é uma fonte de dificuldades na intervenção terapêutica. As falhas ou limitações dos efeitos terapêuticos são algumas das razões pelas quais é necessário modificar tanto a forma de dosagem, como a dose da substância ativa<sup>39</sup>.

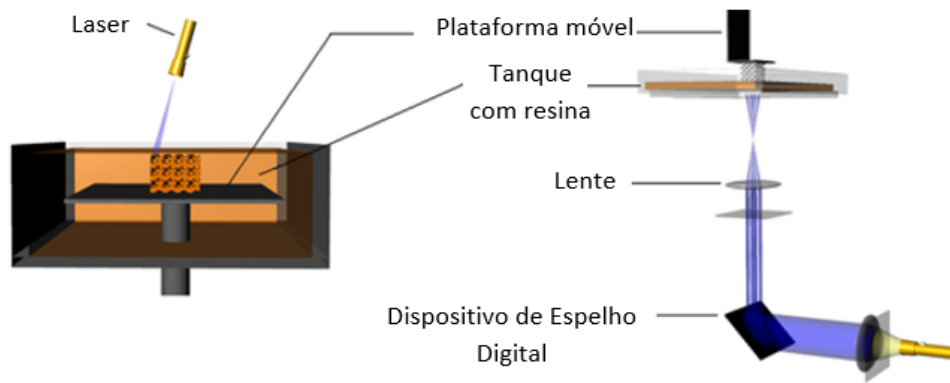
A forma apropriada de dosagem precisa de ser selecionada considerando não apenas as propriedades físico-químicas da população alvo e da patologia a tratar. Dependendo das necessidades de determinadas populações, como é o caso da pediátrica e geriátrica, é comum na prática clínica a subdivisão de comprimidos em duas ou até mesmo quarto partes. Uma subdivisão inadequada ou perda de massa do fármaco podem levar a sobre ou subdosagem<sup>39</sup>. Por estas razões, a implementação da impressão 3D pode tornar-se extremamente útil no desenvolvimento de terapias individualizadas. Por exemplo, têm sido desenvolvidos diversos sistemas de entrega de fármacos usando a impressão 3D, nomeadamente sistemas de libertação controlada oral, microchips, implantes, medicamentos, comprimidos de libertação imediata e formas de libertação de doses multifase. Visto que as formas de dosagem personalizadas são muito desejadas de modo a evitar efeitos adversos desnecessários, corrigir o regime de dosagem e atingir perfis de libertação personalizados, a implementação da tecnologia de impressão 3D apoia também o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos personalizados<sup>9</sup>.

### 1.6.1. Estereolitografia e Processamento Digital de Luz

A SLA é um método de impressão 3D baseado na irradiação por laser, tendo sido a primeira técnica de fabricação de forma livre sólida a ser disponibilizada comercialmente. A produção do objeto 3D por SLA é baseada na solidificação controlada de um foto-polímero, uma resina líquida, por foto-polimerização<sup>9,38-39</sup>. A foto-polimerização é uma técnica que utiliza luz UV ou infravermelha para propagar uma reação de polimerização em cadeia, assim, quando a resina líquida é exposta ao laser UV é curada e solidificada em camadas<sup>8,43</sup>. As resinas comerciais de SLA contêm monómeros/oligómeros reativos à cura por UV ou misturas capazes de realizar ligações cruzadas e fotoiniciadores para ativar este processo de polimerização<sup>43</sup>.

A impressora 3D de SLA, utiliza um raio laser ou um projetor de luz digital, para irradiar luz, num determinado padrão, na superfície da resina que está dentro de um tanque. Desta forma, a resina irradiada é solidificada a uma determinada profundidade levando a que esta adira à plataforma de suporte móvel (Figura 4). Após a foto-polimerização da primeira camada, a plataforma é afastada da superfície e a camada curada é recoberta com a resina líquida. Este processo é repetido até ser formado o objeto 3D camada a camada, na sua totalidade<sup>9,41</sup>. Após a remoção do excesso de resina, obtém-se uma estrutura “verde”, ou seja, uma estrutura em que a conversão dos grupos reativos se encontra incompleta. De forma a melhorar as propriedades mecânicas destas estruturas procede-se a uma pós-cura com luz UV<sup>41</sup>.

Existem diversos parâmetros a considerar e ajustar neste tipo de impressão. Os principais parâmetros que influenciam a qualidade da impressão por SLA são a profundidade da cura, espessura da camada e o processo de pós-cura. O ajuste destes parâmetros fornecem vantagens a esta técnica tais como a alta resolução, minimização do aquecimento durante o processo de impressão, eficácia e versatilidade no tempo de construção, resolução espacial e acabamento da superfície<sup>8,43</sup>. A escolha do fotopolímero é, também, essencial para uma maior qualidade de impressão, e deverá consistir num líquido que solidifique rapidamente quando exposto à luz UV. Resinas de base acrílica são amplamente usadas devido à sua excelente biocompatibilidade, alta resistência ao calor e rápida reatividade. As suas características permitem o uso frequente destas resinas como materiais adequados para a prototipagem de alta resolução de dispositivos biomédicos complexos, nomeadamente implantes dentários e *scaffolds* de engenharia dos tecidos<sup>43</sup>. Um estudo realizado por *Miao et al.*<sup>10</sup> desenvolveu *scaffolds* 3D biocompatíveis a partir da resina OSEA capazes de apoiar o crescimento de células estaminais mesenquimais multipotentes da medula óssea humana.



**Figura 4** – Esquema do princípio de funcionamento da impressão por SLA e DLP.  
Adaptado<sup>42</sup>.

Processamento Digital de Luz (DLP), é uma técnica de impressão 3D semelhante à SLA, sendo que ambas utilizam luz para solidificar uma resina fotopolimérica líquida camada a camada de modo a criar um objeto. A diferença entre a SLA e o DLP, reside no facto de o último usar um dispositivo espelhado digital (Figura 4). O controlo simultâneo de milhões de espelhos permite a cura de uma camada completa de uma só vez, resultando na redução substancial do tempo de produção de uma camada. O DLP torna-se assim uma técnica com uma impressão mais rápida e com um ajustamento mais fácil da espessura da camada comparativamente à SLA<sup>9,40-41</sup>. A vantagem do DLP de curar toda a camada de uma vez, sem diferença entre o contorno e a área interior da camada, torna menos necessário o processo de pós-cura, utilizado na SLA. Adicionalmente, o DLP é menos afetado pela inibição de oxigénio comparativamente à SLA, uma vez que a camada de resina que esta a ser polimerizada se encontra sempre no fundo do tanque e não em contacto direto com o ar<sup>40-41</sup>.

## 1.7. Produtos naturais

Os produtos naturais são moléculas produzidas por uma fonte biológica, que incluem metabolitos secundários, moléculas que não estão diretamente envolvidas no crescimento, desenvolvimento ou reprodução e que não são essenciais à sobrevivência em circunstâncias normais. Estes produtos tipicamente fornecem vantagens competitivas ou intervêm na interação e/ou defesa com outros organismos. A biossíntese de produtos naturais é frequentemente única para um organismo específico e o ambiente em que este reside<sup>45</sup>.

Os produtos naturais têm sido fontes de entidades terapêuticas para uma diversidade de patologias que incluem: doenças oncológicas, neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, imunológicas, inflamatórias e infecciosas. Estes produtos têm adquirido um papel importante na identificação de compostos antibacterianos, uma vez que dos 126 agentes antibacterianos aprovados entre janeiro de 1981 e setembro de 2019, 11 são produtos naturais e 78 são derivados destes produtos<sup>45</sup>.

Agentes antimicrobianos naturais podem ser obtidos de diferentes fontes tais como plantas, animais, bactérias, algas e fungos, mas tem existindo um interesse crescente em antimicrobianos derivados de plantas em alternativa aos antimicrobianos comuns. Para além da sua eficácia, estes compostos exibem a vantagem de as bactérias apresentarem uma menor tendência para desenvolver resistência, uma vez que os compostos naturais poderão abordar simultaneamente vários alvos bacterianos. Certos compostos antimicrobianos derivados de plantas são classificados como GRAS, com uma imagem mais sustentável que poderá ser preferencialmente aceite pelos consumidores. Todos estes fatores sugerem que os antimicrobianos derivados de plantas poderão apresentar um valor significativo nos cuidados de saúde e na indústria uma vez que atendem à procura crescente de produtos mais ecológicos pelos consumidores<sup>46</sup>.

Os óleos essenciais (OE), também designados por óleos voláteis, são líquidos oleosos aromáticos produzidos naturalmente por plantas, conferindo-lhes um cheiro e/ou sabor distinto<sup>47-49</sup>. Estes óleos são obtidos de diversas partes da planta nomeadamente das flores, caules, folhas, sementes, raízes e frutos e armazenados nas cavidades, células secretórias, células epidérmicas, canais ou tricomas glandulares<sup>49</sup>. Os OE são produzidos como metabolitos secundários das plantas e são conhecidos pelas suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, inseticidas, antioxidantes e antivirais<sup>49-51</sup>.

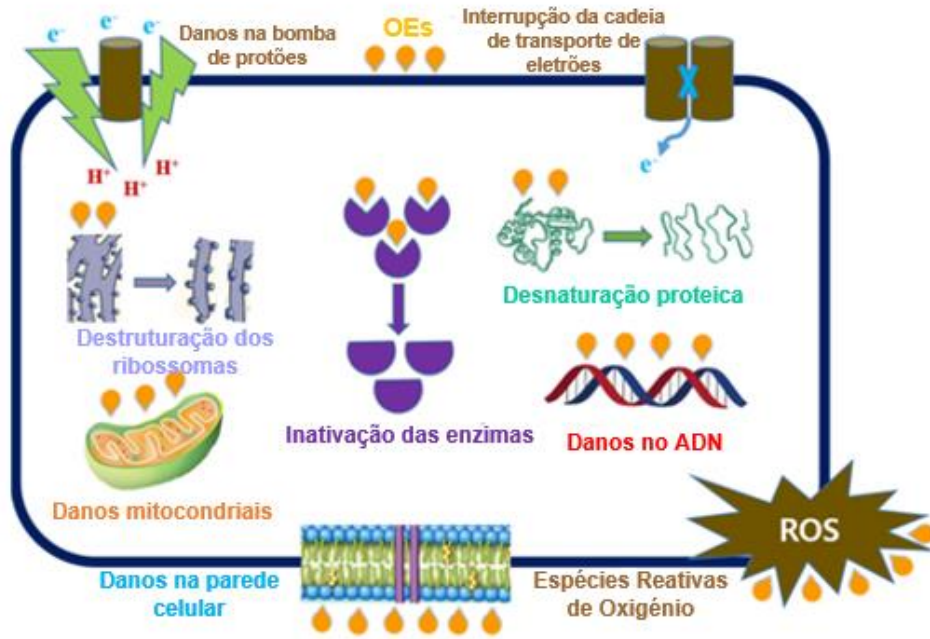
A indústria dos OE tem vindo a tornar-se num mercado altamente ativo e bem-sucedido na última década, uma vez que muitos indivíduos utilizam diversos produtos que contêm estes óleos no seu dia-a-dia, como é o caso dos shampoos, sabonetes, cremes, perfumes, entre outros<sup>52</sup>. No entanto, os OE têm sido utilizados pelo ser humano ao longo dos tempos, não apenas como componentes dos perfumes ou como forma de temperos, mas também na medicina tradicional, devido às suas propriedades biológicas mencionadas anteriormente<sup>47</sup>. O aumento drástico da resistência bacteriana a diversos antibióticos, que se tornou numa das maiores ameaças à saúde pública nos últimos anos, criou uma necessidade acrescida do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos<sup>48,53</sup>. Estudos demonstram que os OE individuais, assim como os seus compostos isolados, apresentam

atividade antimicrobiana contra uma variedade alargada de patógenos<sup>53</sup>. Estas propriedades permitem caracterizar os OE como agentes antimicrobianos naturais<sup>54</sup>.

Os OE são misturas complexas de compostos naturais, contendo dois ou três componentes principais, que constituem 20 a 70% do óleo, e são estes componentes que geralmente determinam as propriedades biológicas do OE. Os componentes principais incluem duas classes de origem biológica distintas, um grupo que consiste em terpenos e terpenóides e outro constituído por componentes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados pelo seu baixo peso molecular. Os OE podem ainda conter uma diversidade de outros compostos, tais como, ácidos gordos, óxidos e derivados do enxofre<sup>47,49</sup>.

A atividade antimicrobiana dos OE é, maioritariamente, uma consequência da sua natureza hidrofóbica. Os mecanismos antibacterianos dos OE dependem maioritariamente nas suas respetivas estruturas, componentes químicos, grupos funcionais e interações sinérgicas. Na generalidade, o mecanismo de ação antibacteriano é mediado por uma série de reações bioquímicas na célula e pelo tipo de constituintes químicos. Adicionalmente, o modo de ação difere para os diferentes tipos de microrganismos, nomeadamente entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. De uma forma geral as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a vários OE devido à sua camada exterior lipopolissacárida hidrofílica, que limita a difusão de compostos hidrofóbicos. Por outro lado, as bactérias Gram-positivas podem facilitar a passagem de compostos hidrofóbicos devido à presença de lipoproteínas na membrana exterior da célula. No entanto, como a maioria dos componentes bioativos presentes nos OE possuem diversos alvos, é difícil prever a suscetibilidade de diferentes bactérias a diferentes OE<sup>54</sup>.

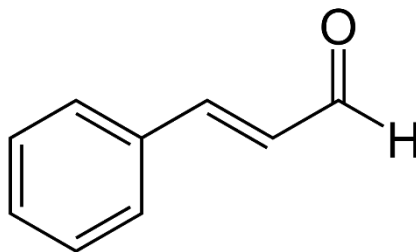
Diversos mecanismos da atividade antibacteriana dos OE têm sido propostos. A sua principal ação antimicrobiana corresponde à destabilização da arquitetura celular, pelos seus compostos hidrofóbicos, que leva à quebra da integridade membranar e aumento da sua permeabilidade. Isto causa a disrupção de várias atividades celulares incluindo a produção de energia, o transporte membranar e outras ações regulatórias metabólicas (perda de iões inorgânicos, redução do potencial de membrana, síntese de ácidos nucleicos, disfunção proteica, colapso da bomba de prótons e eliminação do ATP). Todos estes danos podem consequentemente levar à morte celular<sup>49,54</sup>. Na Figura 5 está descrito um possível mecanismo de ação antibacteriano dos OE.



**Figura 5** – Proposta do mecanismo de ação antibacteriana dos OE<sup>54</sup>.

### 1.7.1. Cinamaldeído

O cinamaldeído é o principal componente encontrado no óleo essencial da canela, sendo o constituinte que confere o odor e sabor à mesma. Trata-se de um líquido viscoso com uma coloração amarelo-pálido que surge naturalmente na casca e nas folhas das árvores de canela da espécie *Cinnamomum* (*Lauraceae*), sendo ainda uma molécula GRAS para preservação de comida pela FDA<sup>52-53</sup>. Apresenta uma massa molar de 132,16 g/mol e a sua estrutura molecular é composta por um anel de benzeno, uma ligação dupla e um grupo aldeído<sup>53-54</sup> (Figura 6).



**Figura 6** – Estrutura molecular do cinamaldeído.

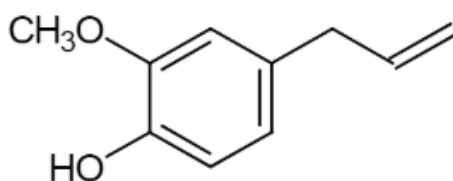
O cinamaldeído é considerado uma importante especiaria e intermediário orgânico, sendo extensamente utilizado na medicina e na indústria alimentar devido às suas fortes

propriedades antibacterianas, antivirais e antissépticas. Adicionalmente possui outras qualidades atrativas tais como propriedades antiparasitas, inseticidas, anticancerígenas, antidiabéticas e pró-cicatrização de feridas<sup>56,58</sup>.

O cinamaldeído apresenta uma atividade antibacteriana através de diversos mecanismos que variam de acordo com o patógeno em questão, tendo sido reportada a sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No caso da *Escherichia coli* (*E.coli*) e da *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), o seu mecanismo de ação envolve a interação do composto com a membrana celular, que resulta no aumento da permeabilidade da célula, alterando a sua morfologia e danificando a integridade da membrana celular conduzindo à lise celular e ao vazamento do conteúdo citoplasmático<sup>58</sup>. Sendo este o mecanismo inerente à generalidade dos OE, descrito previamente no ponto 1.7.

### 1.7.2. Eugenol

O eugenol é um composto aromático pertencente ao grupo dos fenóis, sendo caracterizado como um fenilpropanoide contendo um guaiacol substituído por uma cadeia alilo <sup>59,60</sup>. Apresenta uma massa molar de 164,2 g/mol, é ligeiramente solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos<sup>61</sup>. A sua estrutura molecular está representada na Figura 7. Apresenta-se como um líquido amarelo-pálido e uma consistência oleosa, com um odor a Cravo-da-Índia e um sabor picante, sendo por isso largamente utilizado na indústria cosmética, alimentar, farmacêutica e agrícola <sup>60,62</sup>.



**Figura 7** – Estrutura molecular do eugenol.

O eugenol é comumente obtido dos OE naturais de determinadas plantas, tais como as espécies *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* e *Myristicaceae*, sendo ainda o componente mais importante do óleo do Cravo-da-Índia<sup>59</sup>. Este pode também ser obtido de forma sintética através da alilação do guaiacol com cloreto de alilo ou pode ser produzido por métodos biotecnológicos tais como a biotransformação com o envolvimento de vários microrganismos como *Pseudomonas sp. HR199*, *Corynebacterium sp.*, *Streptomyces sp.*, *E.coli*, *Bacillus cereus*, e *Amycolatopsis sp*<sup>56-57,60</sup>. Diversos estudos demonstram que as

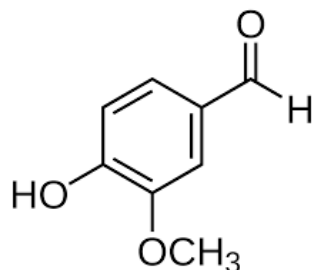
propriedades biológicas benéficas do eugenol incluem características antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais, anticancerígenas, analgésicas e antiespasmódicas<sup>60,64</sup>.

O eugenol demonstrou propriedades antibacterianas contra várias estirpes bacterianas tais como *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E.coli*, sendo que o potencial antimicrobiano é atribuído ao grupo hidroxilo livre presente na sua estrutura molecular<sup>59</sup>. Acredita-se que a ação antibacteriana deste composto contra as bactérias Gram-negativas é centrada em danificar a membrana citoplasmática, uma vez que a sua natureza hidrofóbica permite facilmente penetrar a membrana celular lipopolissacárida e entrar no citoplasma. Estando presente no interior da célula, pode causar alterações à sua estrutura resultando no vazamento de componentes intracelulares. De uma forma semelhante, estudos indicam que o eugenol pode potencialmente inibir a atividade da ATPase ligada a membrana celular na *E.coli*. Acredita-se ainda que este composto natural apresenta a capacidade de produzir espécies reativas de oxigénio intracelulares, que podem causar a morte celular através da inibição do crescimento celular, disrupção da membrana celular e danificação do ADN<sup>59</sup>.

### 1.7.3. Vanilina

A baunilha é um dos sabores mais populares do mundo e é derivada das vagens maduras da orquídea *Vanilla planifolia*. A baunilha é constituída por aproximadamente 200 compostos, no entanto, a sua fragrância e sabor característicos vêm maioritariamente da molécula vanilina<sup>65</sup>.

A vanilina é um metabolito especializado e o ingrediente principal do extrato de baunilha que se encontra numa concentração de 1 a 2% m/m em favas de baunilha curadas. Apresenta uma massa molar de 152,15 g/mol a sua estrutura molecular é composta por um anel aromático ao qual estão ligados diferentes grupos funcionais, nomeadamente os grupos aldeído, hidroxilo e éter, como se pode verificar na Figura 8<sup>65</sup>.

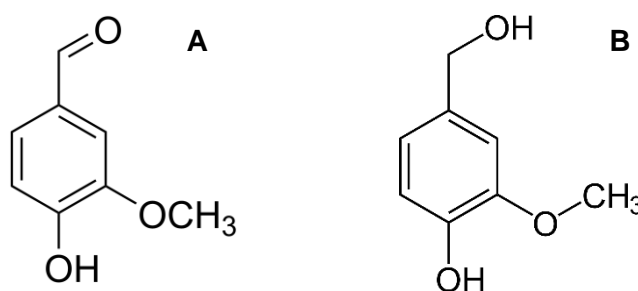


**Figura 8** – Estrutura molecular da vanilina.

A vanilina pode ser obtida de forma natural ou sintética. A vanilina de origem natural é isolada do extrato de baunilha, sendo que a vanilina sintética é produzida a partir de hidrocarbonetos fósseis como o eugenol ou o guaiacol<sup>62-63</sup>. Atualmente, aproximadamente 50% da produção mundial de vanilina sintética é usada como intermediário nas indústrias química e farmacêutica para a produção de herbicidas, papaverina, Levodopa, Metildopa e o agente antimicrobiano Trimetoprim. Este tipo de vanilina é ainda utilizada para produtos domésticos como ambientadores e ceras para o chão<sup>67</sup>.

A vanilina possui diversas características biológicas que incluem propriedades anticancerígenas, neuroprotetoras, potenciação antibiótica, antifúngicas, anti-inflamatórias, entre outras<sup>65,67</sup>. Como outros compostos fenólicos de baixo peso molecular, a vanilina apresenta propriedades antioxidantes e antibacterianas apresentando assim potencial para o uso na preservação dos alimentos. Diversos estudos mostram que a vanilina apresenta atividade antimicrobiana contra leveduras, bolores e bactérias. Este composto demonstrou uma concentração inibitória mínima de 15, 75 e 35 mM para a *E.coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Listeria innocua*, respectivamente. Alguns derivados da vanilina apresentam atividade contra microrganismos infecciosos, indicando que este composto pode comportar-se como um precursor para a síntese de agentes antibacterianos, sendo que a derivação do mesmo melhorou a sua atividade antibacteriana<sup>64-65</sup>.

Neste trabalho foram utilizados dois compostos derivados da vanilina, a *o*-vanilina e o álcool vanílico, cujas estruturas moleculares se encontram representadas na Figuras 9.



**Figura 9** – Estrutura molecular da *o*-vanilina (A) e do álcool vanílico (B).



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes

#### 2.1.1. Produção de filmes e peças 3D

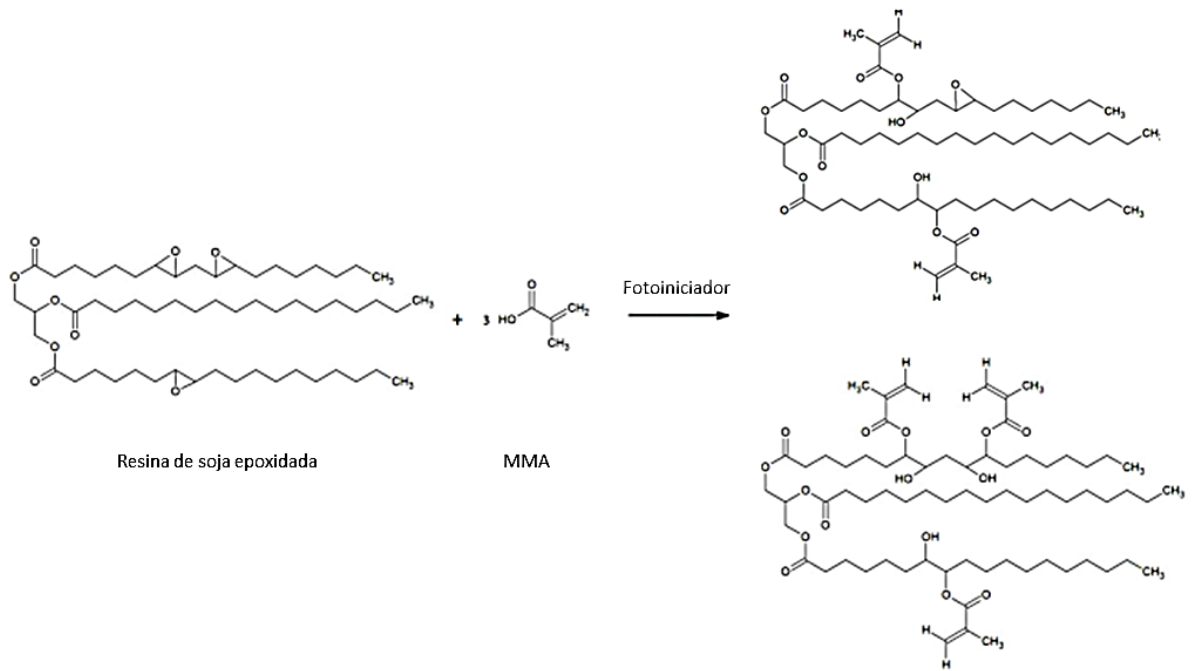
O estudo de desenvolvimento de filmes e peças 3D com potenciais propriedades antimicrobianas iniciou-se com a seleção das resinas e outros biopolímeros utilizados.

A primeira resina que foi testada, para incorporação de compostos com potenciais propriedades antimicrobianas, foi a resina comercial *Anycubic Plant-based UV Resin* adquirida à Anycubic® que apresenta características distintas e vantajosas comparativamente às resinas comuns utilizadas para os mesmos propósitos, que se encontram descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Características da resina Anycubic®<sup>69</sup>.

Caraterísticas	Resinas Comuns	Resina Anycubic®
Odor	Intenso	Suave
Origem	Industrial	Óleo de Soja
Comprimento de onda	405 nm	355 nm - 410 nm
Ecologia	Difícilmente degradável	Biodegradável

De acordo com o fabricante trata-se de uma resina derivada do óleo de soja epoxidado que contém monómeros metil metacrilato (MMA) na sua composição e um fotoiniciador não identificado e cuja estrutura se admite ser maioritariamente a que se apresenta na Figura 10.



**Figura 10** – Possível estrutura química da resina Ancybic®.

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros desta resina.

**Tabela 3** – Parâmetros da resina Ancybic®<sup>69</sup>

<b>Dureza</b>	89 D
<b>Viscosidade</b>	150-135 MPa/s
<b>Densidade do sólido</b>	1,05-1,25 g/cm <sup>3</sup>
<b>Comprimento de onda</b>	355 nm - 410 nm
<b>Força de flexão</b>	40-50 MPa
<b>Força de extensão</b>	35-45 MPa
<b>Deformação térmica</b>	55±5 °C
<b>Alongamento na rotura</b>	8%-12%

Para a realização de outros filmes foi utilizada a resina OSEA, adquirida à Sigma Aldrich e apresenta-se como um líquido viscoso amarelo (18000-32000 cps, a 25 °C), de aspeto semelhante ao mel, com densidade de 1,04 g/mL a 25 °C e estabilizado com 4,000 ppm de monoetil éter hidroquinona como inibidor. O *shellac* usado em combinação com a resina Anycubic® foi adquirido à *A.F sutter and Co,Ltd*.

Os compostos utilizados para produzir os filmes híbridos foram o eugenol (EUG), cinamaldeído (CIN), *o*-vanilina (OV) e álcool vanílico (AV). O EUG e o CIN foram adquiridos à *Thermo Fisher Scientific*, o AV e OV à *Alfa Aesar*.

### **2.1.2. Ensaios microbiológicos**

De modo a realizar os ensaios microbiológicos foram produzidos 3 meios de cultura, sendo estes o meio *Mueller-Hinton broth* (MHB), *Mueller-Hinton Soft* (MHS) e *Mueller-Hinton agar* (MHA). O MHB e o Agar técnico foram adquirido à *Thermo Fisher Scientific* (Oxoid) e o MHA à *Scharlau*.

## **2.2. Preparação dos filmes**

### **2.2.1. Produção dos filmes de resina Anycubic®**

Os filmes de resina Anycubic® foram realizados em placas de Petri, com um diâmetro de 9,5 cm. O volume de resina utilizado foi determinado de modo que os filmes apresentassem uma espessura de 0,1 cm. Os filmes foram incorporados com uma percentagem dos compostos antimicrobianos de 10% (m/m) relativamente à massa de resina utilizada. No caso dos filmes incorporados com CIN, estes foram ainda produzidos com quantidades de 7,5%, 5%, 2,5% e 1% (m/m). Os compostos utilizados foram inicialmente dissolvidos em etanol, com recurso a agitação magnética, sem aquecimento, e quando necessária agitação por ultrassons. A quantidade de etanol utilizada foi a quantidade mínima necessária para dissolver os compostos e a agitação teve uma duração média de 5 minutos. Após a dissolução dos compostos, estes foram incorporados na resina, num copo de precipitação. A mistura contendo os compostos dissolvidos e a resina foi posteriormente transferida para a placa de Petri e colocada sob luz UV de 405 nm, durante 5 minutos.

### **2.2.2. Produção dos filmes de resina Anycubic® e shellac**

Os filmes de resina Anycubic® e shellac foram realizados em placas de Petri, com um diâmetro de 9,5 cm. O volume de resina utilizado foi determinado de modo que os filmes apresentassem uma espessura de 0,1 cm. Os filmes foram produzidos com 75% de resina Anycubic® à qual foi acrescentado 25% de shellac. Os filmes foram incorporados com uma percentagem dos compostos naturais de 10% (m/m) relativamente à massa total de resina utilizada. No caso dos filmes incorporados com CIN, estes foram ainda produzidos com quantidades de 7,5%, 5%, 2,5% e 1% (m/m). Primeiramente foi dissolvido o shellac em etanol, com agitação magnética e a uma temperatura entre 80 °C e 100 °C durante aproximadamente 15 minutos. Após a dissolução completa do shellac foram acrescentados os compostos, continuando a agitação por mais 5 minutos. A mistura homogeneizada foi depois adicionada à resina Anycubic® e mantida em agitação até esta ficar totalmente líquida. A mistura composta foi posteriormente transferida para a placa de Petri e colocada sob luz UV de 405 nm, durante 5 minutos.

### **2.2.3. Produção dos filmes de resina OSEA**

Os filmes de resina OSEA foram realizados em placas de Petri, com um diâmetro de 9,5 cm. O volume de resina utilizado foi determinado de modo que os filmes apresentassem uma espessura de 0,2 cm. Os filmes foram incorporados com uma percentagem dos compostos naturais de 10% (m/m) relativamente à massa total de resina utilizada. No caso dos filmes incorporados com CIN, estes foram ainda produzidos com quantidades de 7,5%, 5%, 2,5% e 1% (m/m). De modo a reduzir o tempo de cura dos filmes foi acrescentado a cada filme, um fotoiniciador, etil fenil (2,4,6-trimetilbenzoil) fosfinato, numa quantidade de 0,5% (m/m) relativamente à massa de resina OSEA utilizada. Os compostos utilizados em conjunto com o fotoiniciador foram dissolvidos em etanol, com recurso a agitação magnética, sem aquecimento, e quando necessária agitação por ultrassons. A mistura foi depois adicionada à resina OSEA e mantida em agitação e a uma temperatura de aproximadamente 50 °C até à homogeneização total. A mistura composta foi posteriormente transferida para a placa de Petri e colocada sob luz UV de 405 nm, durante 10 minutos.

### 2.3. Produção de peças 3D

As peças para impressão 3D foram desenhadas num software de CAD 3D, *Solidworks*. Foram desenhados 4 tipos de peças com um formato cilíndrico, com dimensões distintas, apresentando diâmetros de 10 ou 15 mm e alturas de 5 mm ou 2 mm. As peças foram impressas na impressora 3D *Anycubic Photon Mono*, com um tanque que já tinha sido adequado em trabalhos prévios de modo a necessitar de uma menor quantidade de resina e consequentemente compostos para a impressão das peças pretendidas.

Para imprimir as peças 3D foi utilizada uma massa de resina de 10 g, na qual foram incorporados os compostos numa quantidade de 10% (m/m). No caso da resina OSEA foi ainda acrescentado o fotoiniciador selecionado. A resina foi colocada diretamente no taque de impressão e posteriormente foi adicionada a mistura de etanol com o composto e homogeneizados com uma vareta de vidro.

### 2.4. Ensaio microbiológicos

De modo a avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos selecionados e os filmes produzidos foi utilizada a técnica de sobreposição de *soft-agar*, muito semelhante à técnica de difusão de discos em agar, método usado em muitos laboratórios de microbiologia. Neste método as amostras a testar são colocados sobre um meio de agar solidificado e após incubação, medido o halo de inibição da atividade antibacteriana<sup>3,70</sup>. Neste trabalho foram usadas duas bactérias, uma Gram-positiva, *S.aureus* ATCC25923, e uma Gram-negativa, *E.coli* ATCC25922. Os ensaios foram efetuados em triplicado.

As culturas bacterianas foram cultivadas em cerca de 10 mL de meio MHB, a uma temperatura de 37 °C, condições aeróbicas sob agitação contante de 180 rpm, durante a noite. As colónias de bactérias crescidas durante a noite foram posteriormente transferidas para um meio composto por MHB e 0,5% de agar técnico, o MHS, a uma concentração final de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colónias (cfu) por mL. O meio inoculado foi mantido a 60 °C até finalizar o método. Nas placas de Petri de 9 cm foram colocados 10 mL de meio MHA e esperou-se até à solidificação total. De seguida colocou-se 6 mL da solução de MHS inoculado com as bactérias e deixou-se novamente solidificar. Após a solidificação dos meios colocaram-se os filmes previamente cortados, com um diâmetro de 0,9 cm, os compostos sólidos (2 mg) e os compostos líquidos (2 µL) em discos de papel de filtro. Por fim incubou-se as placas inoculadas a uma temperatura de 37 °C durante a noite. Após incubação mediu-se o halo de inibição e fotografaram-se as placas<sup>71</sup>.

## 2.5. Ensaios de absorção de água

Os ensaios de absorção de água são utilizados para determinar a capacidade de hidratação dos materiais produzidos. A importância deste estudo em aplicações biomédicas que utilizem matrizes poliméricas, advém do facto da biocompatibilidade da matriz poder estar parcialmente relacionada com a sua capacidade de aumentar de volume quando imersas em meio aquoso.

Para realizar estes ensaios foram cortadas amostras retangulares com dimensões de 1x2 cm dos filmes incorporados previamente. Foram utilizadas 2 amostras de cada filme. Seguidamente as amostras foram pesadas ( $m_i$ ) e colocadas num balão de *Erlenmeyer* com 20 mL de água destilada. Deixou-se as amostras dentro de água durante 24 h, à temperatura ambiente. Após as 24h horas, retiraram-se as amostras e secaram-se num papel absorvente. Após estarem completamente secas, pesou-se as amostras novamente ( $m_f$ ). A taxa de absorção de água foi posteriormente calculada utilizando a fórmula<sup>72</sup>:

$$\text{Taxa de absorção de água (\%)} = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100$$

## 2.6. Espectrofotometria Ultravioleta-Visível

A espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis) é uma metodologia analítica pouco dispendiosa, simples e não destrutiva aplicável a uma classe variada de compostos orgânicos e alguns inorgânicos. Esta técnica é baseada em transições eletrónicas das moléculas orgânicas que ocorrem quando estas absorvem a luz e excitam os eletrões de uma orbital de baixa energia para outra de maior energia que esteja desocupada. Sendo assim este método mede a absorvância ou transmitância da luz nas zonas do ultravioleta e da luz visível. O espectrofotómetro emite uma luz de comprimento de onda conhecido que passa pela amostra e um detetor regista a luz transmitida do lado oposto. Com esta informação é possível determinar a quantidade de composto, uma vez que segundo a Lei de *Lamber-Beer* a intensidade da luz absorvida é proporcional à quantidade de amostra que absorve no material analisado<sup>73</sup>. Neste trabalho foi utilizado um espectrofotómetro da *Agilent Technologies Carry 60 UV-Vis*.

### **2.6.1. Ensaios de libertação controlada**

De modo a verificar e quantificar a libertação do composto incorporado nos filmes poliméricos, estes foram cortados em círculos com um diâmetro de 0,9 cm. De seguida os filmes cortados foram colocados num balão de *Erlenmeyer* contendo etanol. As quantidades de etanol variaram entre 100 mL e 200 mL e utilizou-se 3 amostras de cada filme. A libertação foi avaliada por espectrofotometria UV-Vis. Durante a primeira hora de libertação, a absorvância foi medida de 15 em 15 minutos e após a primeira hora, em intervalos de 30 minutos. Os dados foram posteriormente tratados numa folha de cálculo de forma a obter a percentagem de libertação dos compostos.

## **2.7. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier com Reflexão Total Atenuada**

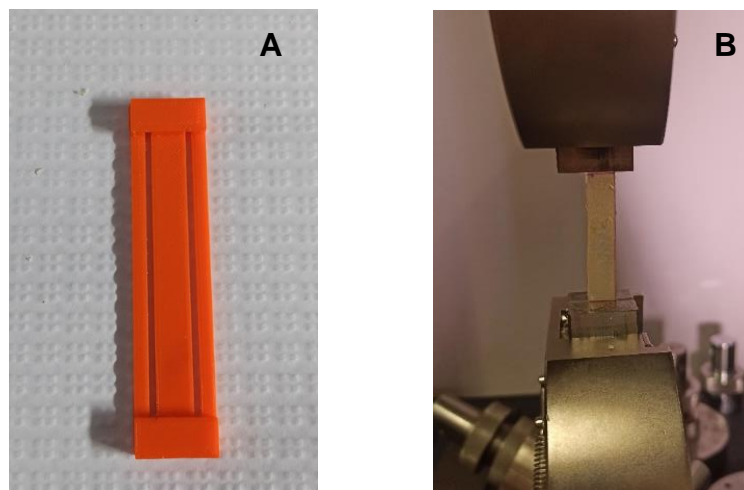
A espectroscopia de infravermelho é uma técnica de caracterização essencial para elucidar a estrutura da matéria a nível molecular. A composição química e o arranjo das ligações dos constituintes das matérias poliméricas pode ser obtida utilizando esta técnica. Os espectrómetros de FTIR adquirem o espectro infravermelho pela transformação de Fourier do sinal de um interferómetro com um espelho móvel para produzir uma transformação do sinal infravermelho. O espectrómetro pode operar nos modos de transmissão ou reflexão, mas também no modo da reflexão total atenuada (ATR). Neste modo a reflexão infravermelha é atenuada pela absorção da camada superficial da amostra. A absorção versus a frequência característica da luz transmitida pela amostra irradiada fornece a estrutura molecular da espécie em questão. Portanto, o FTIR permite determinar os componentes ou os grupos de átomos que absorvem a radiação infravermelha em frequências específicas permitindo a identificação da estrutura molecular<sup>74</sup>.

Neste trabalho, os espectros FTIR-ATR foram obtidos com recurso a um equipamento *Shimadzu IRA Affinity-1S*. Foram adquiridos espectros por cada amostra dos filmes produzidos e respetivos compostos, obtidos entre 4000 e 650  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e 36 varrimentos.

## 2.8. Ensaios de tração

Num ensaio de tração uma amostra de tamanho uniforme e standard é colocada numa máquina de testes mecânicos, que regista a força e o deslocamento atingidos durante o ensaio. Neste trabalho, uma vez que os materiais testados são de origem polimérica, optou-se por utilizar os provetes adaptados de acordo com os valores definidos pela norma ASTM D882. O tamanho adequado da secção a testar deverá, então, ser de 50 mm de comprimento, uma vez que a generalidade dos provetes tinha espessura inferior a 1 mm<sup>75</sup>.

Para a realização do ensaio de tração, tendo em consideração a norma apresentada, os filmes produzidos foram cortados com dimensões de 50 mm x 10 mm. De modo a obter amostras uniformes foi utilizado um molde produzido por impressão 3D, representado na Figura 11-A. Na Figura 11-B encontra-se apresentado um exemplo da colocação das amostras no equipamento. Para este trabalho foi utilizado o equipamento Instron 5966.

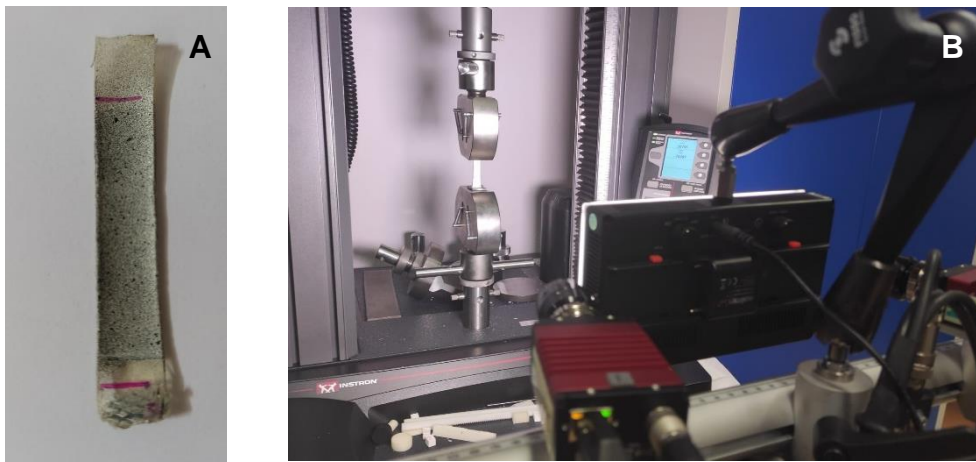


**Figura 11 – A –** Peça de auxílio para o corte de amostras; **B –** Ensaio de tração de um filme de resina Anycubic® e shellac.

Adicionalmente foi ainda utilizada uma tecnologia para efetuar a medição das deformações dos materiais em estudo, denominada de sistema DIC (*Digital Image Correlation*). Esta técnica consiste num sistema ótico tridimensional que permite efetuar medições da deformação e deslocamento do material selecionado<sup>76</sup>. Este sistema capta imagens a alta frequência através de duas câmaras, correlacionando-as posteriormente. Para utilizar este sistema é necessário fazer a pintura prévia dos provetes, primeiro com uma tinta branca e depois com tinta preta (Figura 12), de forma a criar o contraste que permite determinar a posição instantânea dos vários pontos pretos existentes no provete, pelo *software*<sup>77</sup>. O sistema DIC utilizado foi da Dantec Dynamics, Modelo Q-400 3D,

equipado com duas câmaras com uma resolução de 6 megapixéis, com 50,2 lentes focais e abertura de f/8. As imagens foram registadas a uma frequência de 10 Hz. O *software* que permite a correlação de imagens foi o Instra 4D.

Optou-se por este sistema de medição, pois o mais convencional de extensometria, necessária para determinar algumas propriedades, nomeadamente o módulo de *Young*, promovia uma fratura precoce do provete.



**Figura 12** – Provetes utilizados **(A)** e ensaio com utilização do sistema DIC **(B)**.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Preparação e caracterização de filmes antimicrobianos

Os filmes produzidos para este trabalho foram realizados com 3 bases poliméricas distintas, nomeadamente a resina Anycubic®, a resina OSEA e uma mistura de resina Anycubic® e shellac (75:25 m/m). Todos os filmes poliméricos foram dopados com 10% (m/m) de CIN, EUG, OV e AV respetivamente de acordo com as referências apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 4 – Filmes poliméricos produzidos.**

Filmes		
Base Polimérica	Composto	Código
Resina Anycubic®	Sem Composto	RI
	10% de EUG	RI-EUG
	10% de CIN	RI-CIN
	10% de OV	RI-OV
	10% de AV	RI-AV
Resina Anycubic® e shellac	Sem Composto	RS
	10% de EUG	RS-EUG
	10% de CIN	RS-CIN
	10% de OV	RS-OV
	10% de AV	RS-AV
Resina OSEA	Sem Composto	OSEA
	10% de EUG	OSEA-EUG
	10% de CIN	OSEA-CIN
	10% de OV	OSEA-OV
	10% de AV	OSEA-AV

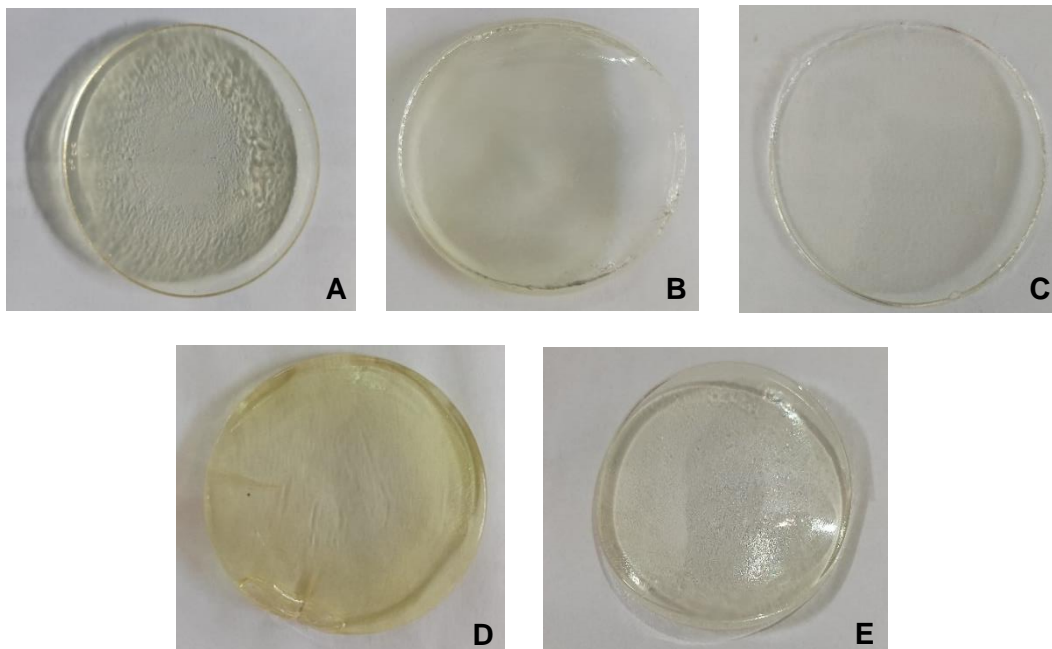
Para os filmes dopados com CIN, onde os resultados de atividade antimicrobiana se revelaram promissores, produziram-se ainda filmes de resina Anycubic® e shellac e de resina OSEA incorporados com percentagens de 7,5%, 5%, 2,5% e 1% (m/m) deste composto (Tabela 4).

**Tabela 5** – Filmes poliméricos produzidos com diferentes quantidades de CIN.

Filmes		
Base Polimérica	Composto	Código
Resina Anycubic® e shellac	7,5% de CIN	RS-7,5CIN
	5% de CIN	RS-5CIN
	2,5% de CIN	RS-2,5CIN
	1% de CIN	RS-1CIN
Resina OSEA	7,5% de CIN	OSEA-7,5CIN
	5% de CIN	OSEA-5CIN
	2,5% de CIN	OSEA-2,5CIN
	1% de CIN	OSEA-1CIN

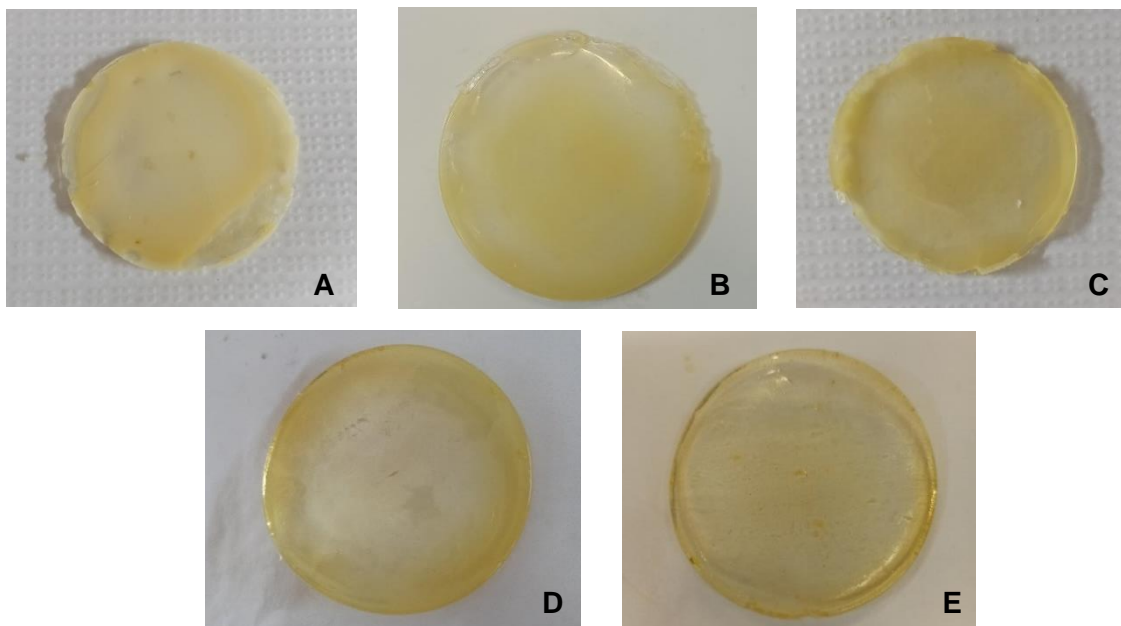
### 3.1.1. Filmes de resina Anycubic®.

Os filmes de resina Anycubic® foram produzidos de acordo com a metodologia descrita no ponto 2 – Materiais e Métodos. Após a cura, de aproximadamente 5 minutos, os filmes apresentavam uma espessura de 1 mm e aspeto transparente tanto no filme controlo (RI) como nos filmes dopados com EUG e CIN. Os filmes incorporados com OV e AV apresentavam um aspeto amarelado, consequência da cor amarela destes compostos, como apresentado na Figura 13. Todos os filmes se revelaram pouco flexíveis e bastante frágeis e quebradiços.

**Figura 13** – Filmes de resina Anycubic®; **A)** RI; **B)** RI-EUG; **C)** RI-CIN; **D)** RI-OV; **E)** RI-AV

### 3.1.2. Filmes de resina Anycubic® e shellac

Os filmes de resina Anycubic® e shellac foram produzidos de acordo com a metodologia descrita no ponto 2 – Materiais e Métodos. Após a cura de aproximadamente 5 minutos, os filmes apresentavam uma espessura de 1 mm. Comparativamente aos filmes produzidos com resina Anycubic®, estes não demonstram a mesma transparência e todos exibiram uma coloração mais amarelada, consequência da cor do shellac, como está representado na Figura 14. Os filmes preparados com esta mistura de resinas apresentaram maior elasticidade/flexibilidade e menor fragilidade comparativamente aos filmes produzidos com resina Anycubic®.

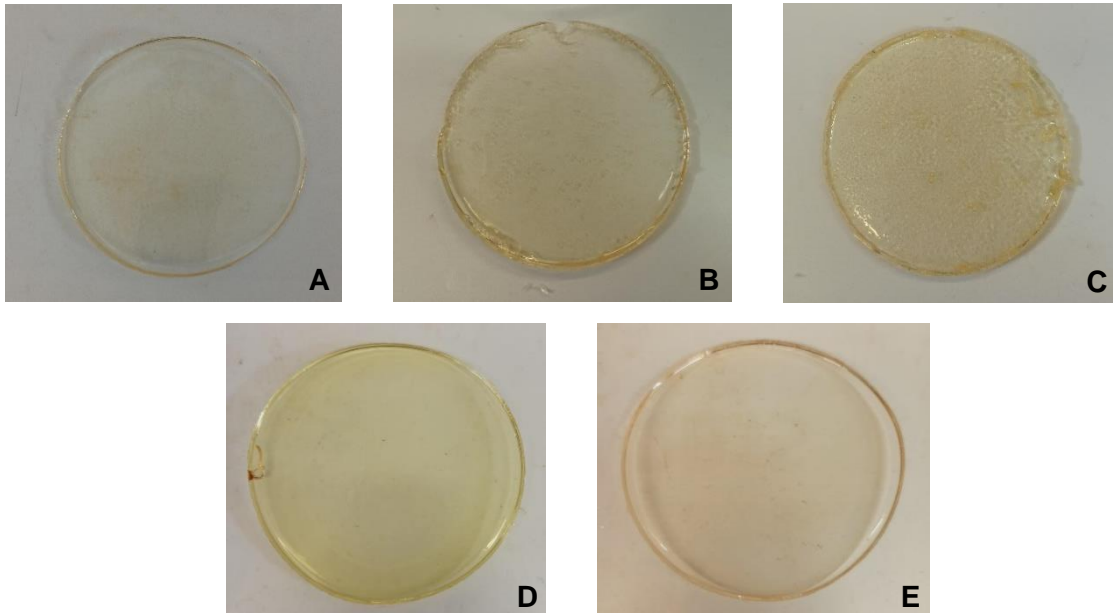


**Figura 14** – Filmes de resina Anycubic® e shellac; **A)** RS; **B)** RS-EUG; **C)** RS-CIN; **D)** RS-OV; **E)** RS-AV.

### 3.1.3. Filmes de resina OSEA

Os filmes de resina OSEA foram produzidos de acordo com a metodologia descrita no ponto 2 – Materiais e Métodos. Após o processo de cura, de aproximadamente 10 minutos, os filmes apresentavam uma espessura de aproximadamente 2 mm. Todos os filmes produzidos com resina OSEA incluem 0,5% de etil fenil (2,4,6-trimetilbenzoil) fosfinato, selecionado como fotoiniciador, para o filme realizar o processo de cura completo. Todos os filmes têm uma coloração amarela resultado de cor da própria resina, como se pode verificar na Figura 15. Estes exibiam alguma transparência e comparativamente aos

filmes anteriormente mencionados apresentaram maior fragilidade. Após a cura, os filmes encontravam-se ligeiramente viscosos pelo que foram limpos com etanol.



**Figura 15** – Filmes de resina OSEA; **A)** OSEA; **B)** OSEA-EUG; **C)** OSEA-CIN; **D)** OSEA-OV; **E)** OSEA-AV.

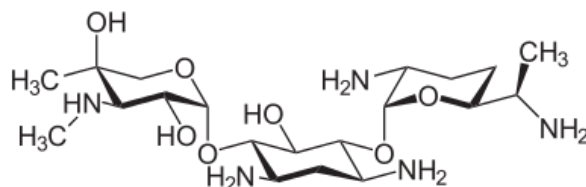
### **3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes**

A atividade antimicrobiana de todos os filmes produzidos foi avaliada numa técnica de sobreposição de *soft-agar* contra duas estirpes de bactérias, uma Gram-positiva, *S.aureus* ATCC 25923, e uma Gram-negativa, a *E.coli* ATCC25922. Este teste é um método simples e de fácil aplicação, comumente utilizado para avaliar se o agente antimicrobiano incorporado na matriz do filme polimérico inibe o crescimento microbiano, avaliando desta forma os novos materiais produzidos como possíveis matrizes para a produção de peças com aplicabilidade na área da engenharia biomédica.

As propriedades antimicrobianas dos filmes foram avaliadas pela presença ou ausência do crescimento das bactérias em estudo, na área de contacto do disco do filme com a superfície de agar medindo o halo de inibição formado.

### 3.2.1. Filmes de controlo e compostos isolados

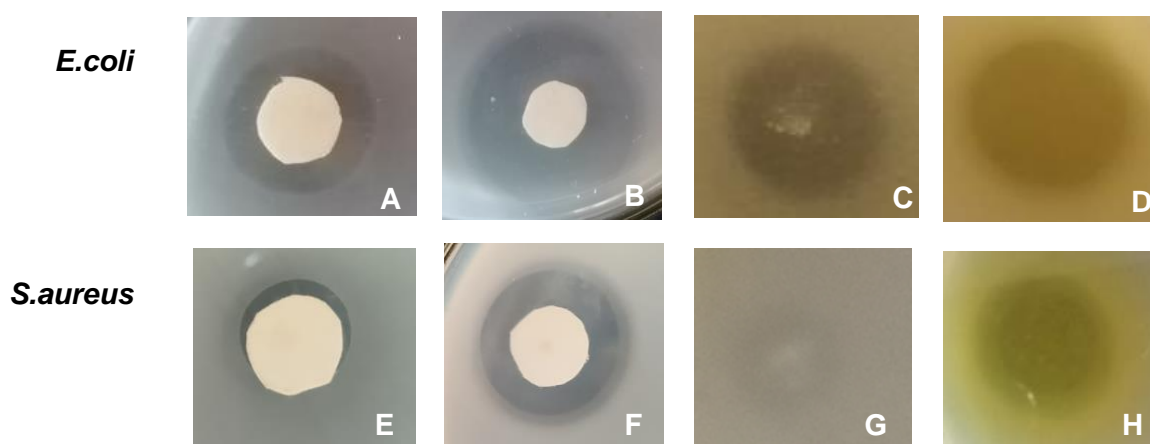
Como controlo positivo, foram produzidos filmes das 3 bases poliméricas estudadas incorporados com 1% de gentamicina, um antibiótico aminoglicosídeo que exibe atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas aeróbicas e algumas bactérias Gram-positivas, sendo utilizado para o tratamento de diversas infeções comuns<sup>75-76</sup> e cuja estrutura molecular se apresenta na Figura 16.



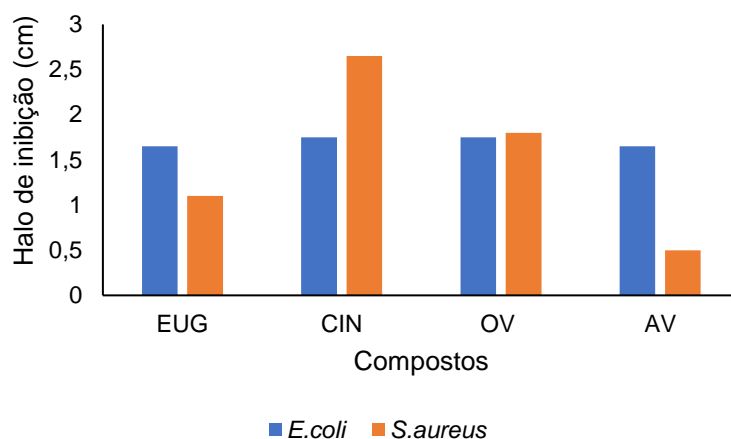
**Figura 16** – Estrutura molecular da gentamicina.

Os filmes controlo positivo, das três bases incorporados com 1% (m/m) de gentamicina, foram referenciados da seguinte forma: filme de resina Anycubic®: RI-GEN; filme de resina Anycubic® e shellac: RS-GEN e o filme de resina OSEA: OSEA-GEN. Como controlo negativo foram utilizados os filmes das três bases poliméricas sem qualquer composto incorporado.

O potencial antimicrobiano dos compostos isolados (EUG, CIN, OV e AV) foi avaliado para a quantidade de 2 mg e 2 µL e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17.



**Figura 17** – Imagens dos testes de difusão dos compostos; **A)** e **E)** EUG; **B)** e **F)** CIN; **C)** e **G)** OV; **D)** e **H)** AV.



**Figura 18** – Gráfico representativo do halo de inibição dos compostos contra a *E.coli* e a *S.aureus*.

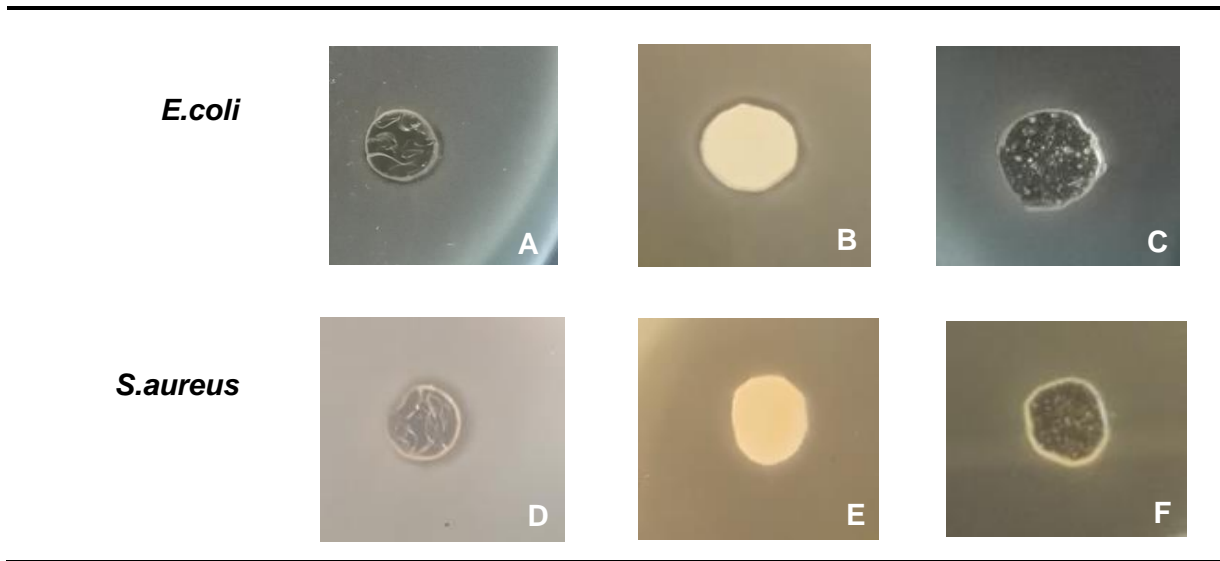
A análise das imagens apresentadas na Figura 17 permite verificar que todos os compostos em estudo promoveram a formação de halo de inibição, para ambas as estirpes estudadas. De acordo com o comprimento do halo formado (Figura 18) verifica-se que, relativamente à *E. coli*, os quatro compostos (EUG, CIN, OV e AV) apresentam resultados semelhantes, nas condições em estudo. No que se refere à avaliação contra a *S. aureus*, o comportamento observado foi diferente, com valores de inibição crescentes de acordo com a sequência: AV, EUG, OV e CIN.

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com os dados da literatura nos quais as bactérias Gram-negativas são tendencialmente mais resistentes a diversos OE, moléculas caracterizadas pela sua natureza hidrofóbica, consequência sua camada exterior lipossacárida ser mais impermeável a este tipo de compostos<sup>54,80</sup>. De forma a avaliar a lipofilicidade dos compostos foi determinado o valor do LogP, no *software Chemdraw*. Verificou-se que o EUG e o CIN apresentam valores mais elevados de 2,57 e 1,93 respetivamente, enquanto a OV e o AV exibem valores inferiores de 1,27 e 0,94. Estes valores demonstram que os compostos que apresentam maior lipofilicidade são mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas, como é descrito na literatura e como se verificou neste ensaio.

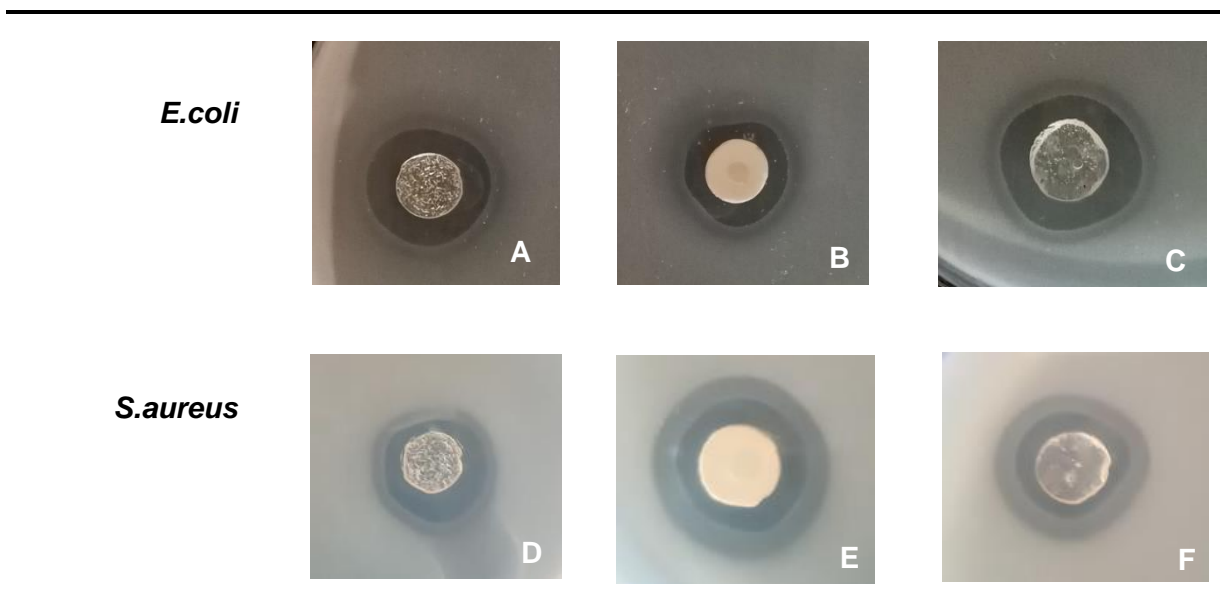
Deste ensaio conclui-se que os compostos em estudo (EUG, CIN, OV e AV) apresentam atividade antimicrobiana nas condições do mesmo.

Analisados os compostos procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes controlo positivo (RI-GEN, RS-GEN, OESA-GEN) e controlo negativo (RI, RS e

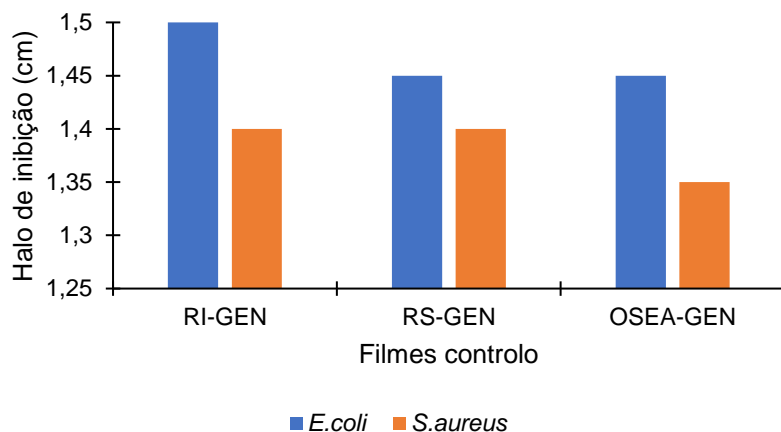
OSEA). Nas Figuras 19, 20 e 21 estão apresentados os resultados visuais e os valores dos halos de inibição, respetivamente, obtidos para as referidas amostras.



**Figura 19** – Imagens dos testes de difusão dos filmes controlo negativo; **A) e D)** RI; **B) e E)** RS; **C) e F)** OSEA.



**Figura 20** – Imagens dos testes de difusão dos filmes controlo positivo; **A) e D)** RI-GEN; **B) e E)** RS-GEN; **C) e F)** OSEA-GEN.



**Figura 21** – Gráfico representativo do halo de inibição dos filmes de controlo positivo contra a *E.coli* e a *S.aureus*.

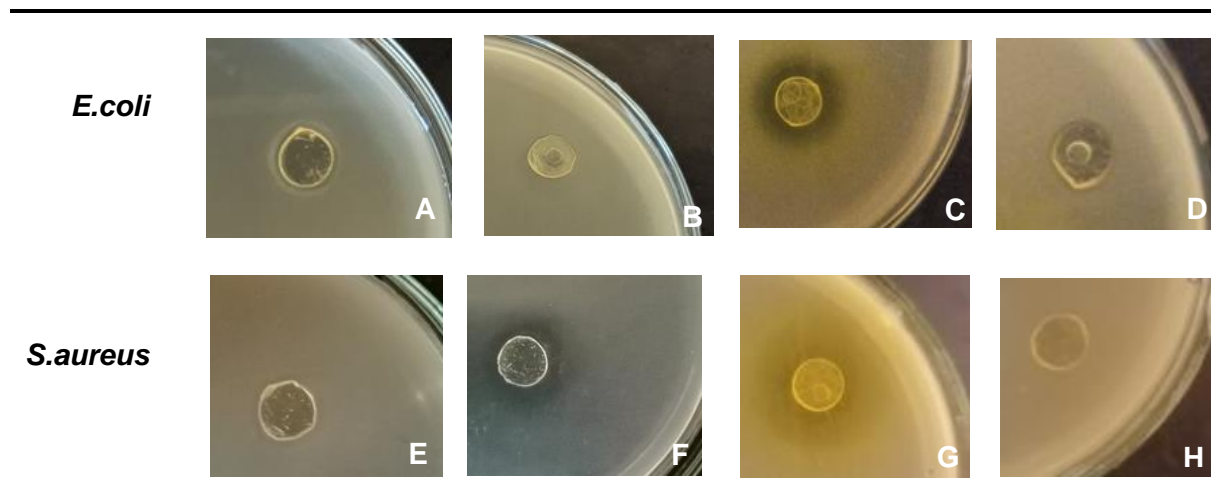
É possível verificar que os filmes controlo negativo (RI, RS e OSEA) não apresentaram formação de halo de inibição e, conseqüentemente, atividade antibacteriana, assegurando que nenhuma das matrizes poliméricas em estudo, por si só, promove a inibição do crescimento bacteriano para as estirpes estudadas, tal como esperado atendendo a que não têm incorporado os agentes antimicrobianos. Este resultado assegura que a existir inibição do crescimento nos materiais dopados, esta resultará da libertação do agente ativo incorporado nos filmes.

No caso dos filmes controlo positivo, incorporados com 1% de gentamicina, (RI-GEN, RS-GEN e OSEA-GEN) pode verificar-se que em todos os casos existiu formação de halo de inibição e, conseqüentemente, todos apresentaram atividade antimicrobiana para ambas as estirpes estudadas, validando desta forma o que era esperado uma vez que, como referido, a gentamicina é um antimicrobiano potente. Este resultado assegura que existiu libertação da gentamicina de todas as matrizes dos filmes em estudo.

### 3.2.2. Filmes de resina Anycubic®

Os resultados obtidos para os filmes de resina Anycubic®, incorporados com 10% (m/m) dos compostos selecionados, apresentam-se na Figura 22. A sua análise revela que os filmes dopados com CIN e OV apresentaram formação de halo de inibição. No entanto, pode verificar-se que para o filme RI-OV a inibição de crescimento bacteriano foi visível para ambas as estirpes, enquanto no filme RI-CIN, só se observou para a inibição de

crescimento da estirpe *S. aureus* (Figura 22-B,F e 22-C,G). Para os dois filmes restantes, nomeadamente, RI-EUG e RI-AV, não se verificou a formação de um halo de inibição, tal como se visualiza na Figura 22-A,E e 22-D,H.

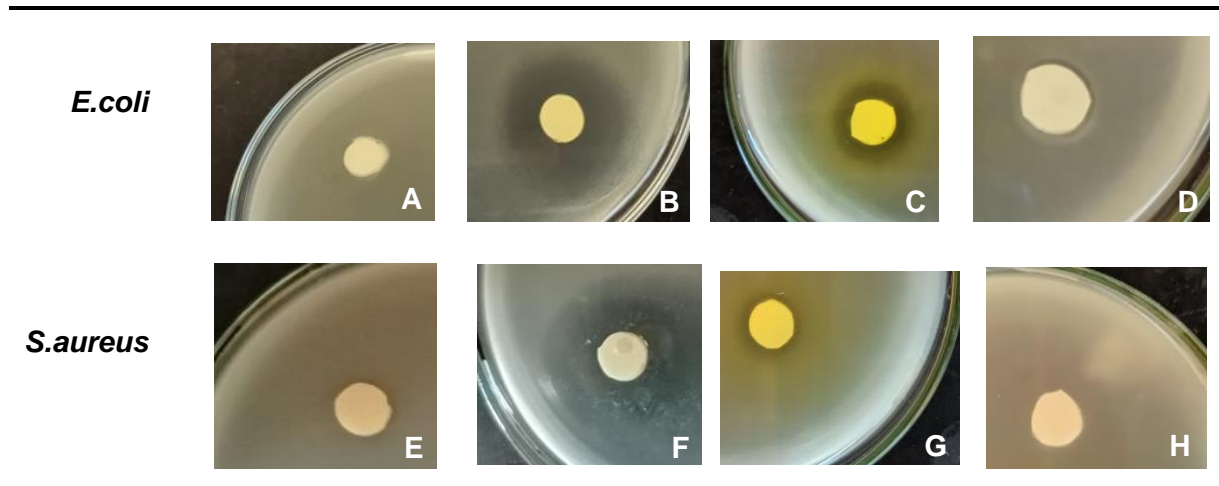


**Figura 22** – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina Anycubic dopados; **A) e E)** RI-EUG; **B) e F)** RI-CIN; **C) e G)** RI-OV; **D) e H)** RI-AV.

Tendo em consideração, que os compostos isolados apresentaram atividade antibacteriana relativamente às estirpes em estudo, o facto de os filmes RI-EUG e RI-AV não formarem um halo de inibição nas estirpes testadas sugere que poderá existir uma interação entre a matriz polimérica e os compostos, que não permite uma difusão mais eficaz da matriz polimérica no tempo de ensaio. Contudo existem outros fatores tais como a fraca solubilidade em meio aquoso e a polaridade que podem também ter contribuído para os resultados observados.

### 3.2.3. Filmes de resina Anycubic® e shellac

Face aos fracos resultados de atividade antimicrobiana obtidos com os filmes incorporados produzidos com a resina Anycubic® e com o objetivo de aumentar porosidade da matriz foram produzidos filmes cuja matriz resulta de uma mistura 75:25% (m/m) de resina Anycubic® com shellac. Todos os filmes foram incorporados com 10% (m/m) dos compostos antimicrobianos em estudo e os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana podem ser visualizados na Figura 23.

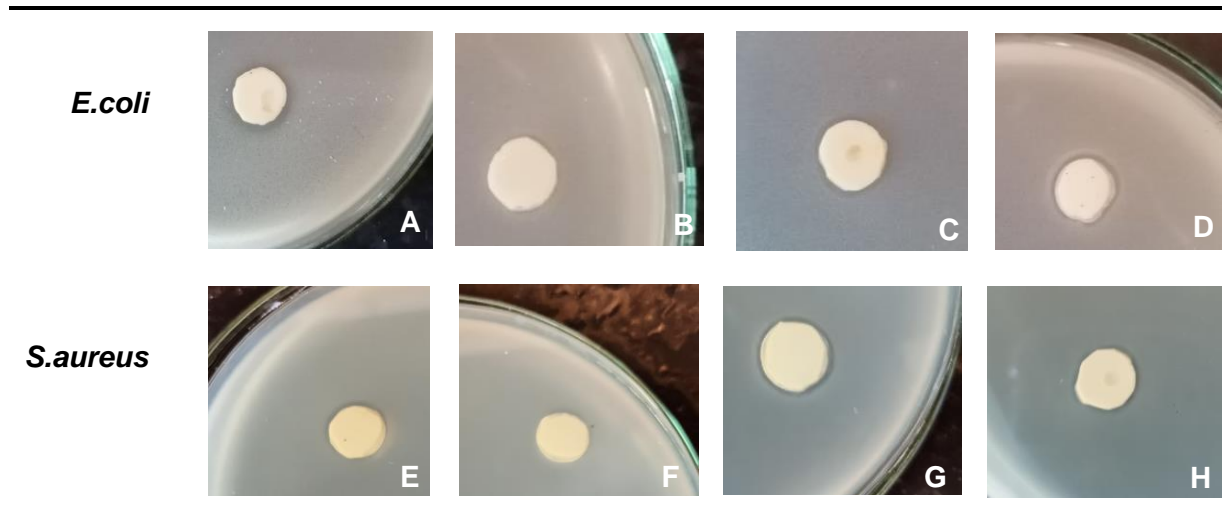


**Figura 23** – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina Anycubic® e shellac dopados; **A) e E)** RS-EUG; **B) e F)** RS-CIN; **C) e G)** RS-OV; **D) e H)** RS-AV.

A análise dos resultados permite verificar que a incorporação de shellac não trouxe melhorias significativas à libertação dos compostos da matriz mista (resina Anycubic® e shellac) relativamente ao observado para a matriz de resina Anycubic®. No entanto, verificou-se que a libertação do CIN foi mais eficaz pois os halos de inibição formados pelos filmes RS-CIN foram superiores (1,8 cm para a *E.coli* e 2,2 cm para a *S.aureus*) aos formados com os filmes semelhantes de resina Anycubic® (0 cm para a *E.coli* e 1,5 cm para a *S.aureus*).

O CIN mostra-se assim como o composto com melhor atividade antibacteriana quando incorporado nestes filmes. Face aos resultados obtidos optou-se por aprofundar o estudo variando a quantidade de CIN e produziram-se filmes com quantidades inferiores do composto, nomeadamente 7,5%, 5%, 2,5% e 1% (m/m) de modo a tentar encontrar a quantidade mínima necessária de CIN para que os filmes dopados apresentassem atividade antibacteriana.

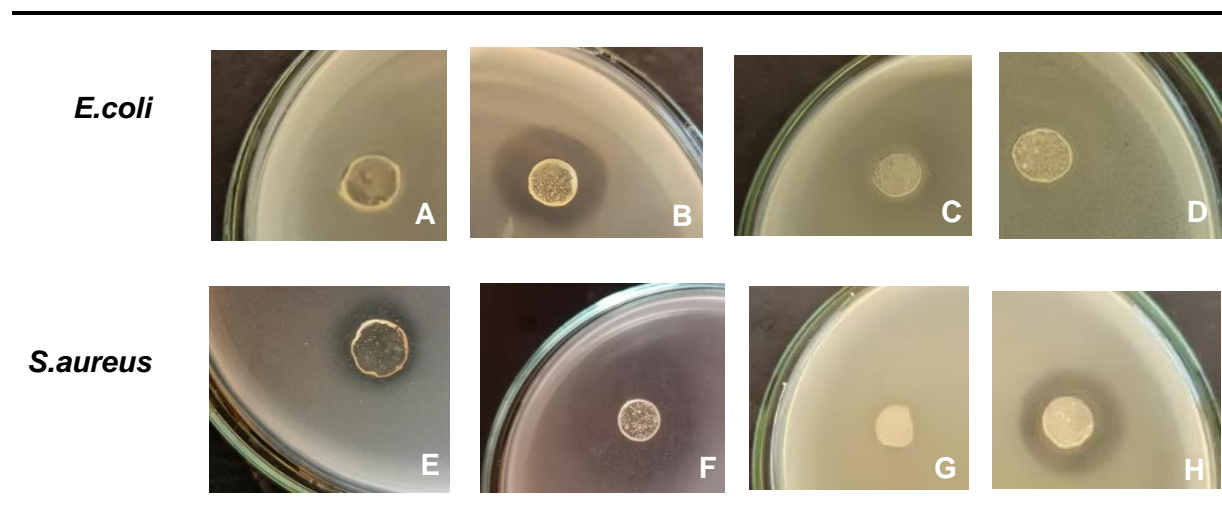
Inesperadamente nenhum dos novos filmes produzidos de resina Anycubic® e shellac com quantidades inferiores de CIN (RS-7,5CIN, RS-5CIN, RS-2,5CIN e RS-1CIN) apresentou formação de um halo de inibição (Figura 24). Este resultado sugere que 10% (m/m) de CIN é a quantidade mínima para a produção de um material com características antimicrobianas, nesta base polimérica.



**Figura 24** – Imagens dos testes de difusão dos filmes dopados de resina Anycubic® e shellac; **A) e E)** RS-7,5CIN; **B) e F)** RS-5CIN; **C) e G)** RS-2,5CIN; **D) e H)** RS-1CIN.

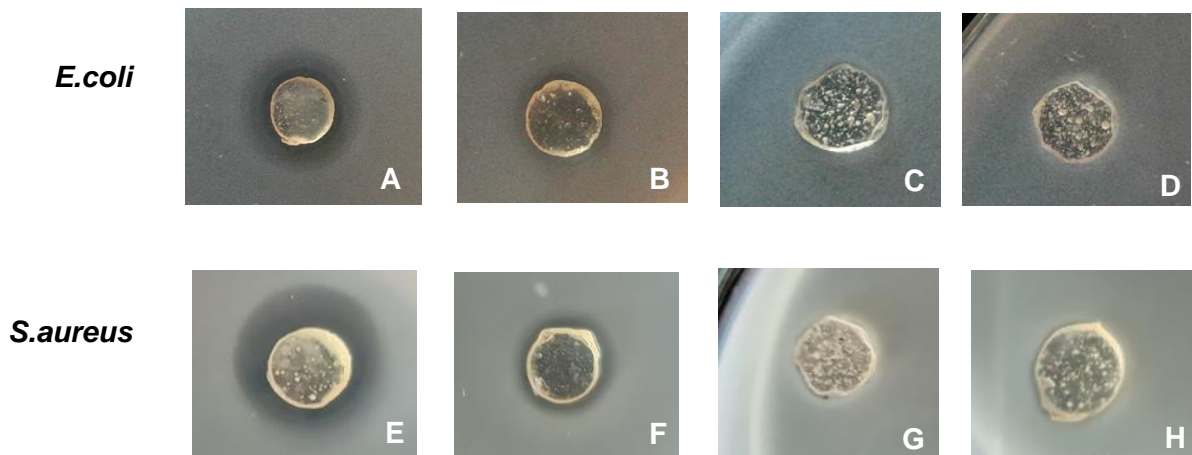
### 3.2.4. Filmes de resina OSEA

À semelhança dos filmes previamente mencionados, os filmes de resina OSEA incorporados com os compostos naturais foram também avaliados relativamente à sua atividade antibacteriana. Os resultados obtidos para os filmes de resina OSEA com 10% (m/m) dos quatro compostos em estudo apresentam-se na Figura 26.



**Figura 25** – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina OSEA dopados; **A) e E)** OSEA-EUG; **B) e F)** OSEA-CIN; **C) e G)** OSEA-OV; **D) e H)** OSEA-AV.

Verificou-se que os filmes incorporados, com os quatro compostos em estudo, produzidos com resina OSEA apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana que os filmes semelhantes produzidos quer com resina Anycubic® quer com a mistura 75:25 resina Anycubic® e shellac. A análise das imagens apresentadas na Figura 25, mostra que existiu formação de halo de inibição para todos os filmes contra a estirpe *S. aureus*, sugerindo que a libertação da matriz polimérica é mais eficaz nos filmes de resina OSEA. Também neste caso o resultado mais promissor foi obtido para o filme incorporado com CIN, pelo que, à semelhança do descrito para mistura resina Anycubic® e shellac, se procedeu à produção de filmes de OSEA com quantidades inferiores de CIN, nomeadamente OSEA-7,5CIN, OSEA-5CIN, OSEA-2,5CIN e OSEA-1CIN, de forma a avaliar a sua atividade antimicrobiana (Figura 26).



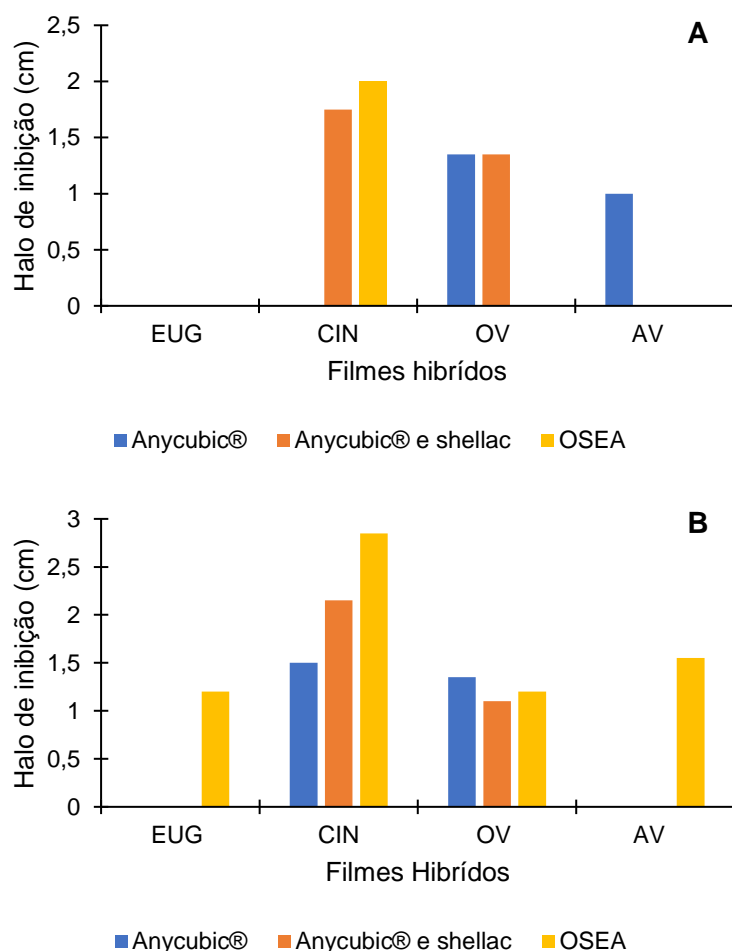
---

**Figura 26** – Imagens dos testes de difusão dos filmes de resina OSEA dopados; **A) e E)** OSEA-7,5CIN; **B) e F)** OSEA-5CIN; **C) e G)** OSEA-2,5CIN; **D) e H)** OSEA-1CIN.

Pela observação dos resultados da Figura 26, consta-se que existiu halo de inibição nos filmes OSEA-7,5CIN e OSEA-5CIN para ambas as estirpes de bactérias estudadas o que sugere que 5% (m/m) de CIN é a quantidade mínima para a produção de um material com características antimicrobianas, nesta base polimérica.

### 3.2.5. Análise comparativa dos resultados dos ensaios antimicrobianos

Com base nos resultados obtidos, constata-se que a atividade antibacteriana foi diferente consoante a base polimérica dos filmes e os compostos nelas incorporados. Existiu ainda uma diferença na atividade antimicrobiana relativamente à bactéria, Gram-negativa ou Gram-positiva. Na generalidade os filmes híbridos tiveram uma atividade inibitória mais eficaz contra a *S.aureus* (Gram-positiva), como se pode constatar pelos resultados apresentados na Figura 27. Com base no tamanho do halo de inibição formado, constata-se que os filmes de resina OSEA incorporados com CIN apresentaram a melhor atividade antibacteriana contra ambas as estirpes estudadas. No caso dos filmes dopados com EUG, estes apenas apresentaram atividade antibacteriana nos filmes produzidos com OSEA contra a *S.aureus*.

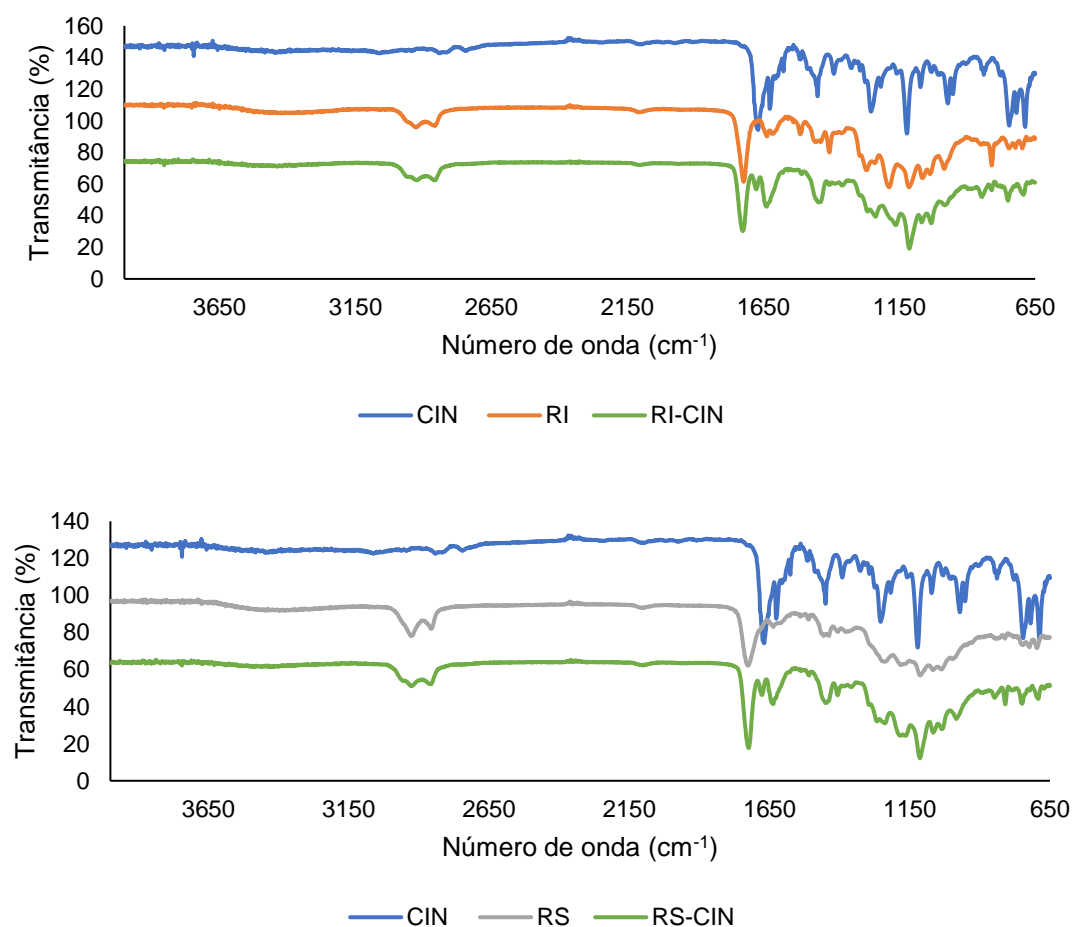


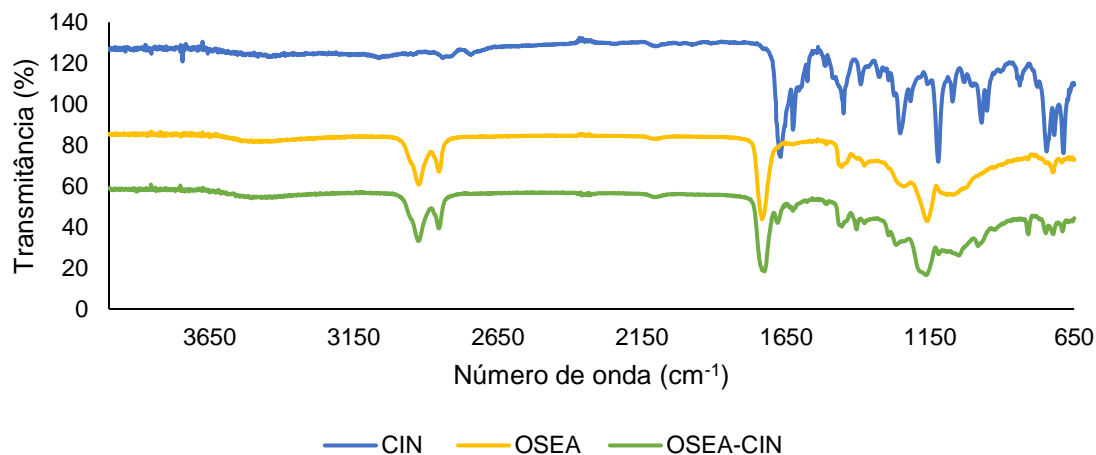
**Figura 27** – Gráfico representativo do halo de inibição dos filmes híbridos contra a *E.coli* (A) e a *S.aureus* (B).

Os filmes produzidos com a resina OSEA foram os que apresentaram melhores resultados de inibição contra a bactéria Gram-negativa, uma vez que todos os filmes dopados apresentaram atividade antibacteriana. O CIN foi o composto com a maior capacidade de libertação dos filmes, especialmente nos ensaios realizados com a *S.aureus*, uma vez os filmes produzidos com as 3 bases poliméricas apresentam uma boa atividade antibacteriana. Contra esta bactéria, a OV também demonstrou ser um agente antimicrobiano promissor nas bases poliméricas utilizadas, no entanto com valores de inibição inferiores ao CIN.

### 3.3. Análise de FTIR-ATR

A técnica analítica FTIR-ATR, foi utilizada para investigar eventuais alterações macromoleculares e possíveis interações estabelecidas entre os polímeros base e os diferentes compostos ativos incorporados. Todos os filmes produzidos foram analisados e os espectros de FTIR-ATR comparados com os obtidos para os compostos utilizados e respetivos filmes controlo, para cada grupo. Na Figura 28 apresentam-se, como exemplo, os espectros de FTIR-ATR, para os filmes de resina Anycubic®, resina Anycubic® e shellac e resina OSEA incorporados com o CIN.





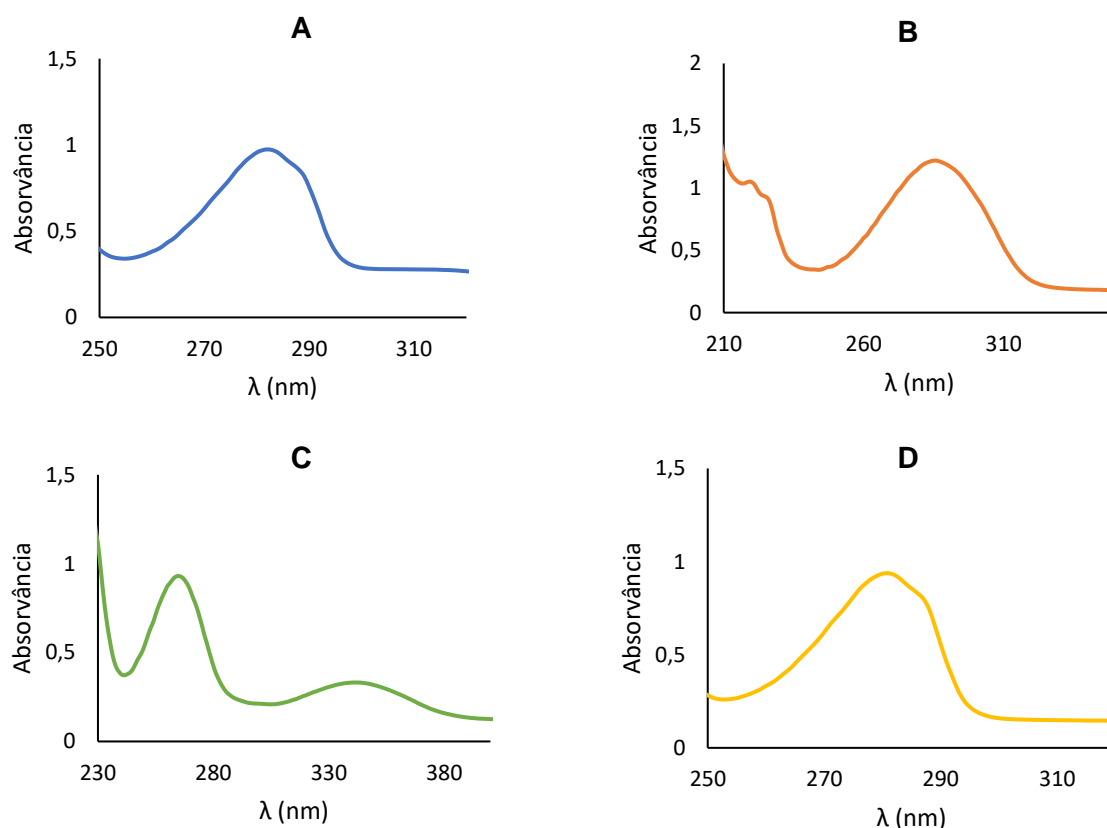
**Figura 28** – Espectros FTIR-ATR dos filmes de resina Anycubic®, resina Anycubic® e shellac e resina OSEA, incorporados com CIN.

De uma maneira geral, os espectros dos filmes dopados, não apresentam diferenças significativas relativamente ao espectro do filme de controlo, para cada grupo. É também possível verificar que para os três casos, nos espectros dos filmes controlo (RI, RS e OSEA) é possível identificar, as bandas de estiramento características dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  das cadeias saturadas observadas a  $2920$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  e a banda de flexão C-H identificada a  $1450\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de alongamento características de éster (C=O) e (C-O) foram observadas a  $1720\text{ cm}^{-1}$  e  $1241\text{ cm}^{-1}$ , respetivamente, caracterizando desta forma a estrutura das resinas derivadas do óleo de soja. Todas estas bandas são identificadas de forma expressiva nos filmes dopados produzidos, uma vez que 90% do material do filme é composto pela base polimérica. Ainda assim, é possível identificar a presença dos compostos ativos incorporados. No exemplo da incorporação de CIN é identificada a presença da banda a  $1670\text{ cm}^{-1}$ , característica do grupo carbonilo presente na sua estrutura, nos espectros FTIR-ATR dos filmes RI-CIN, RS-CIN e OSEA-CIN.

Análise semelhante foi feita para todos os outros filmes dopados, cujos espectros se encontram apresentados no Anexo 1, 2 e 3 e os compostos incorporados identificados da mesma forma. No entanto, a análise dos resultados de FTIR-ATR não permitiu identificar alterações nas matrizes poliméricas importantes que permitissem concluir sobre a forma de interação dos diferentes compostos nas matrizes.

### 3.4. Ensaios de Liberação Controlada

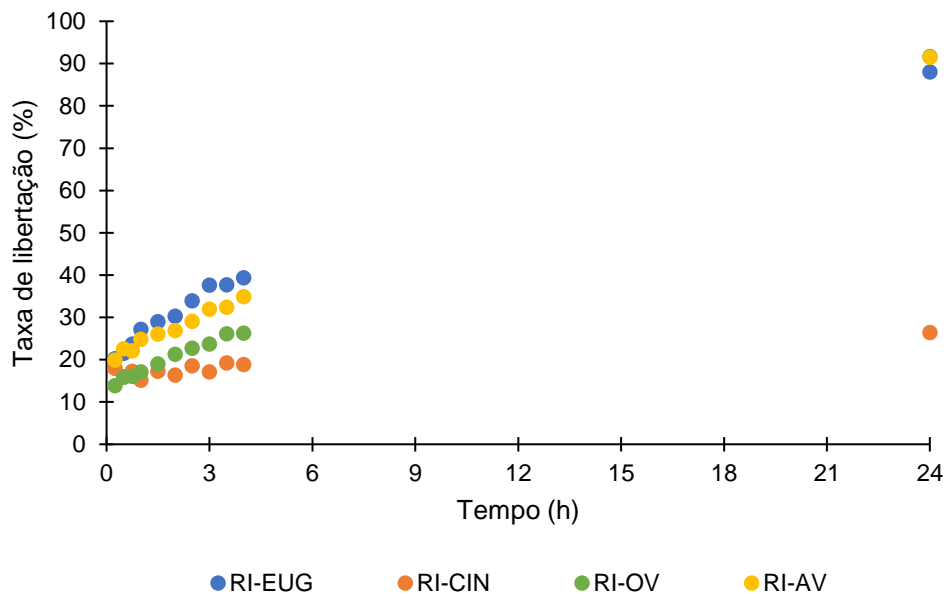
De modo a realizar os ensaios de liberação controlada foram obtidos os espectros UV-vis dos compostos (EUG, CIN, OV e AV) incorporados nos diferentes filmes, que se apresentam na Figura 29. Para cada composto foi selecionado o comprimento de onda ( $\lambda$ ) onde a absorvância era máxima, e os ensaios de liberação, em etanol, foram realizados a esse valor. Foram utilizados os valores máximos de 280 nm, 285 nm, 340 nm e 280 nm para o EUG, CIN, OV e AV, respetivamente.



**Figura 29** – Espectros de UV-vis (em etanol) dos compostos utilizados; **A)** EUG ( $2,4 \times 10^{-4}$  mol/L); **B)** CIN ( $3,9 \times 10^{-5}$  mol/L); **C)** OV ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L); **D)** AV ( $2 \times 10^{-4}$  mol/L).

#### 3.4.1. Filmes de resina Anycubic®

Os perfis de liberação, em etanol, dos filmes de resina Anycubic® (RI-EUG, RI-CIN, RI-OV e RI-AV) foram realizados em etanol durante 24 h e apresentam-se na Figura 30.



**Figura 30** – Perfis de liberação dos filmes RI-EUG, RI-CIN, RI-OV e RI-AV, em função do tempo.

A análise dos resultados permite verificar que existe uma semelhança no perfil de liberação dos filmes RI-EUG, RI-AV e RI-OV, com uma tendência de liberação gradual e linear ao longo do tempo, tendo-se atingido percentagens de 88%, 92%, e 92%, respetivamente, nas 24 h em estudo. No filme RI-CIN o comportamento, apesar de linear, não apresentou um perfil crescente. Nos trinta minutos iniciais registou-se uma liberação de 17% que se manteve praticamente constante (20%) no final de 24 h de ensaio.

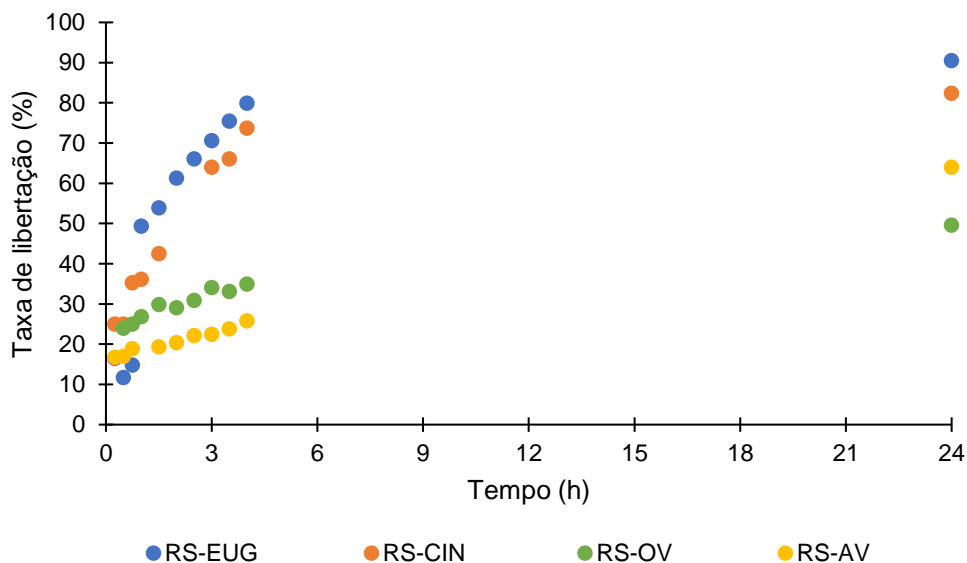
No caso do filme dopado com EUG, verifica-se uma taxa de liberação de 40% após 4h de ensaio que aumenta para os 88%, após 24 h e que se mantém praticamente constante após 48 h. Os filmes dopados com OV e AV seguem a mesma tendência, com liberações ligeiramente mais baixas nas primeiras horas, de 26% e 34%, respetivamente. Nestes dois filmes verifica-se a liberação quase total da quantidade do composto (92%) após as 24 h, para ambos os filmes, que registam os máximos de 99% após 48 h de ensaio.

O filme incorporado com CIN apesar de, matematicamente, apresentar um perfil semelhante, os valores de liberação registados são significativamente inferiores aos obtidos para os restantes compostos, só registando 19% de liberação nas primeiras 4h, subindo linearmente para os 26% após 24 h de ensaio. Após 72 h de ensaio registou-se um valor de 38%, revelando que este material apresenta uma liberação muito lenta do composto da matriz polimérica o que poderá ser vantajoso em aplicações de longa duração,

onde o objetivo será a liberação progressiva e em baixas quantidades do composto em questão.

### 3.4.2. Filmes de resina Anycubic® e shellac

Os perfis de liberação, em etanol, dos filmes de resina Anycubic® com shellac incorporados com os compostos previamente mencionados, até às 24 h de liberação, estão representados na Figura 31.



**Figura 31** – Perfis de liberação dos filmes RS-EUG, RS-CIN, RS-OV e RS-AV, em função do tempo.

Pela análise dos perfis de liberação obtidos pode-se verificar que existem dois comportamentos distintos. Os filmes RS-EUG e RS-CIN, apresentaram um comportamento exponencial atingindo valores de liberação elevados nas primeiras 4 h de ensaio, quando comparados com os obtidos para os filmes RS-OV e RS-AV.

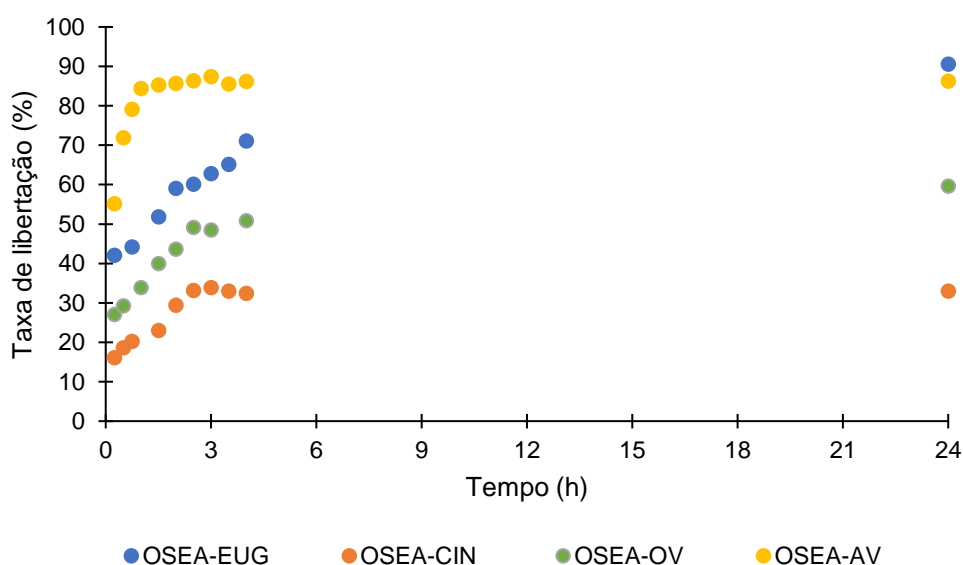
No caso do filme RS-EUG, após as primeiras 4 h de ensaio observou-se uma liberação de 80% do composto incorporado, valor que aumenta para os 90% após 24 h de ensaio. O filme RS-CIN apresenta também uma liberação elevada atingindo 82% após 4 h de ensaio, valor que se mantém praticamente inalterado após as 24 h. Estes dois compostos apresentam estruturas químicas semelhantes, podendo ser este o motivo dos seus perfis de liberação apresentarem estas semelhanças entre si.

Relativamente ao filme RS-OV, este apresenta uma liberação consideravelmente mais baixa nas primeiras 4 h de ensaio, com um valor de 35%, que vai subindo

gradualmente para 50% após 24 h de ensaio. Face aos resultados prolongou-se o tempo de ensaio e no final de 72 h observou-se que a percentagem de libertação subiu para os 62% (dados não apresentados na Figura 31). Um comportamento semelhante foi observado para o filme RS-AV tendo-se registado uma percentagem de libertação de 26% após 4 h que aumenta para os 64% no final das 24 h. Para estes dois compostos os resultados revelam uma libertação mais gradual. As diferenças observadas sugerem que, uma vez que a matriz é a mesma, a libertação dos compostos depende essencialmente das diferentes interações que se estabeleceram entre a matriz e os compostos.

### 3.4.3. Filmes de resina OSEA

Os perfis de libertação, em etanol, dos filmes de resina OSEA incorporados com os compostos previamente mencionados, até às 24 h de libertação, estão representados na



**Figura 32** – Perfis de libertação dos filmes OSEA-EUG, OSEA-CIN, OSEA-OV e OSEA-AV, em função do tempo.

Relativamente aos filmes produzidos com a resina OSEA todos eles apresentaram um perfil de libertação em que a difusão dos compostos da matriz ocorre nas primeiras 4 h de ensaio.

Para o filme OSEA-EUG, registou-se uma libertação de 71% após 4 h de ensaio, aumentando progressivamente para os 91% após 24 h. A libertação do filme OSEA-AV foi muito rápida, uma vez que ao após 30 minutos de ensaio 72% do composto se encontrava em solução, valor que aumentou para 86% após 24h.

No que diz respeito ao filme OSEA-OV, aproximadamente 50% do composto é libertado nas primeiras 4 h de ensaio, valor que aumenta para os 60% após 24 h. O filme OSEA-CIN apresenta uma baixa percentagem de libertação, de apenas 32% após 4 h, valor este que se mantém após 24 h.

#### 3.4.4. Análise conjunta dos resultados de libertação

Na Tabela 6 encontram-se sumarizados os valores da taxa de libertação dos diversos filmes produzidos, em etanol, após 4 h e 24 h de ensaio.

**Tabela 6** – Resultados de libertação, em etanol, dos diferentes filmes híbridos, após 4 h e 24 h de ensaio.

Filmes híbridos	Taxa de Libertação (%)	
	4h	24h
RI-EUG	39	88
RI-CIN	19	26
RI-OV	26	92
RI-AV	34	92
RS-EUG	80	91
RS-CIN	82	83
RS-OV	35	50
RS-AV	26	64
OSEA-EUG	71	92
OSEA-CIN	32	33
OSEA-OV	51	60
OSEA-AV	86	86

Na generalidade, a maioria dos filmes híbridos produzidos apresentaram boas taxas de libertação após 24h de ensaio. Verifica-se que a libertação do EUG se revelou bastante promissora para as três matrizes em estudo relativamente aos restantes compostos. Em contraste, os filmes incorporados com CIN exibem taxas de libertação muito inferiores nas bases utilizadas, com a exceção do filme OSEA-CIN que nas primeiras 4h de ensaio liberta 82% do composto.

Nos filmes de resina Anycubic® e de resina Anycubic® e shellac dopados com OV e AV, os perfis de liberação foram muito similares nas primeiras horas de ensaio, com valores que variam entre os 26% e os 35% que têm tendência para aumentar substancialmente após as 24 h, especialmente nos filmes de resina Anycubic®. No caso destes filmes produzidos com a resina OSEA os perfis de liberação diferem dos anteriormente mencionados, uma vez que grande parte do composto é libertado nas primeiras 4 h de ensaio.

Os resultados apresentados sugerem que existem diferentes interações dos compostos com a base polimérica onde são incorporados, especialmente uma forte interação dos compostos OV e AV com a mistura de resina Anycubic® e shellac. No caso do CIN, parece existir também uma forte interação com as bases poliméricas que não permitem a liberação da maior parte do composto incorporado, uma vez que os valores de liberação são muito baixos quando utilizadas as duas resinas de soja em estudo, exceto quando incorporado na mistura de resina Anycubic e shellac, onde apresentou valores de liberação consideravelmente superiores.

#### **3.4.5. Estudos da cinética de liberação**

De modo a determinar os mecanismos de liberação dos filmes estudados, o modelo a adotar foi uma Lei de Potência,  $F = Kt^n$  a qual representa uma relação não linear entre  $F$  e  $t$ . Este foi considerado o modelo de ajustamento adequado ao estudo em questão, onde  $t$  é a variável temporal e  $K$  e  $n$  são parâmetros.

Como o modelo apresentado é não linear, a abordagem, para determinar os melhores valores de  $K$  e  $n$ , consistiu em proceder a uma linearização da seguinte forma:

$$\ln F = \ln(Kt^n)$$

$$(\Rightarrow) \ln F = \ln K + \ln t^n$$

$$(\Rightarrow) \ln F = \ln k + n \ln t$$

Substituindo  $\ln F$  por  $y$ ,  $\ln k$  por  $a_0$ ,  $n$  por  $a_1$  e  $\ln t$  por  $x$ , repare-se que  $y = \ln F$  varia linearmente com  $x = \ln t$ . Deste modo, passa-se de uma relação não linear inicial  $t/F$  para uma relação linear  $x = \ln t / y = \ln F$ , representada analiticamente pela expressão:

$$y = a_0 + a_1x$$

Neste contexto, como resultado da análise da regressão linear obtida surgem os valores  $a_0$  e  $a_1$ , o que permite de seguida determinar os valores de  $K$  e  $n$ . Considerando as libertações de todos os filmes em estudo, foram determinados estes valores para cada amostra (ensaio de libertação). De seguida apresenta-se como exemplo os cálculos efetuados para o ensaio de libertação do filme OSEA-CIN.

Utilizando o modelo acima descrito, e de acordo com os dados experimentais obtidos, foi obtida uma reta de regressão linear com a seguinte expressão:

$$y = 3,1337 + 0,1966x$$

Como  $a_0 = \ln K$ , logo  $\ln k = 3,1337$  e conseqüentemente  $K=22,95877$  e  $n=0,1966$ . Logo,

$$F = 22,95877 t^{0,1966}$$

Foram determinados os valores para os ensaios de libertação dos restantes filmes estando a informação resumida na Tabela 7.

**Tabela 7 – Valores obtidos do estudo cinético de libertação dos filmes**

Filmes	n	Mecanismo de transporte de substâncias ativas
RI-EUG	2,707	Cinética de ordem zero
RI-CIN	0,4273	Cinética de ordem zero
RI-OV	3,2362	Cinética de ordem zero
RI-AV	2,9423	Cinética de ordem zero
RS-EUG	0,5293	Anómalo
RS-CIN	0,3207	Difusão quase Fickiana
RS-OV	0,1698	Difusão quase Fickiana
RS-AV	1,9733	Cinética de ordem zero
OSEA-EUG	0,1898	Difusão quase Fickiana
OSEA-CIN	0,1966	Difusão quase Fickiana
OSEA-OV	0,2025	Difusão quase Fickiana
OSEA-AV	0,080	Difusão quase Fickiana

Pelos resultados apresentados na Tabela 7, verifica-se que todos os filmes de resina Anycubic® apresentaram um perfil de libertação que não se ajustou ao modelo de difusão de *Fick*. Os resultados obtidos, nas 24 h dos ensaios de libertação, para os quatro compostos ativos incorporados nesta resina, são expressos por uma regressão linear, o que se traduz num modelo de libertação de ordem zero. Este modelo sugere que a matriz em causa não se desagrega facilmente e que os compostos se encontram mais “bloqueados” dentro da matriz, resultando numa libertação mais lenta e constante ao longo do tempo.

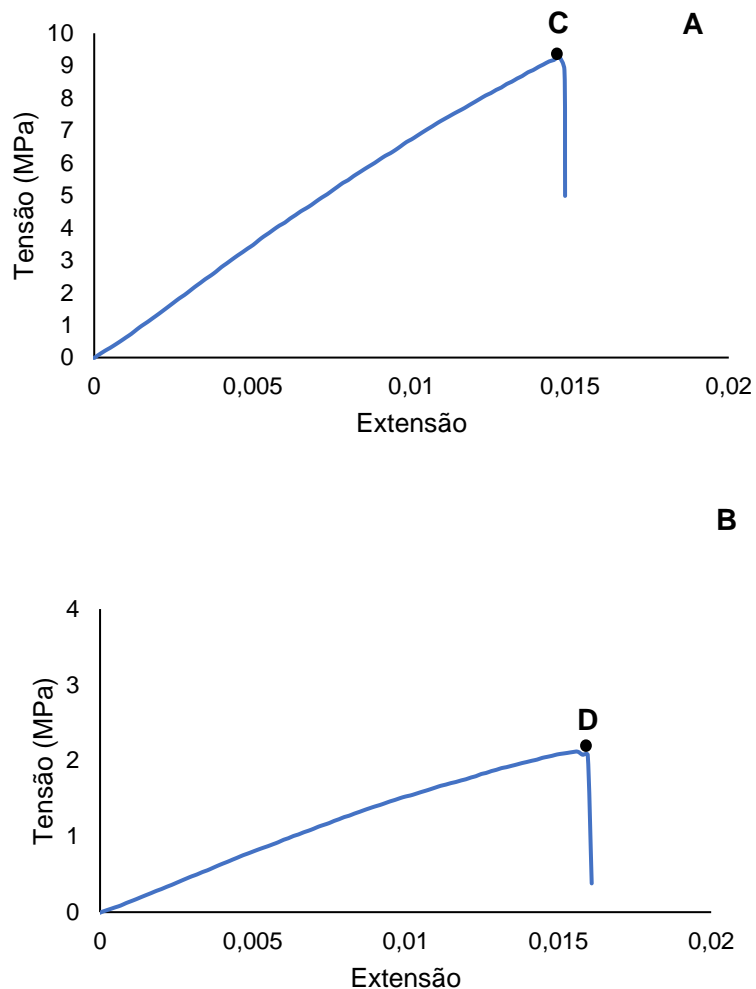
Para a matriz resina Anycubic® e shellac, os dados experimentais de libertação do EUG, CIN e OV permitiram o ajuste ao modelo de difusão de *Fick* verificou-se que os valores de  $n$  obtidos permitem concluir que a libertação do EUG não obedece ao modelo (com  $n > 0,5$ ) e que o CIN e a OV obedecem ao modelo, com valores de  $n < 0,5$ , sugerindo que a libertação destes compostos desta matriz é mais rápida nas primeiras horas de contacto com o fluído. Relativamente à libertação do AV, da mesma matriz, os resultados obtidos sugerem uma libertação linear ao longo do tempo, revelando que, para este composto, a libertação segue uma cinética diferente e mais lenta que a dos três compostos iniciais.

Para a matriz de OSEA, os resultados obtidos nos ensaios de libertação de todos os compostos incorporados, permitiram um ajuste ao modelo de difusão de *Fick*, com valores de  $n < 0,5$ , sugerindo que a maior parte dos compostos se liberta nas primeiras horas de ensaio. Estes resultados sugerem que a incorporação dos compostos na resina OSEA não se encontra tão “bloqueada” como nas matrizes anteriores.

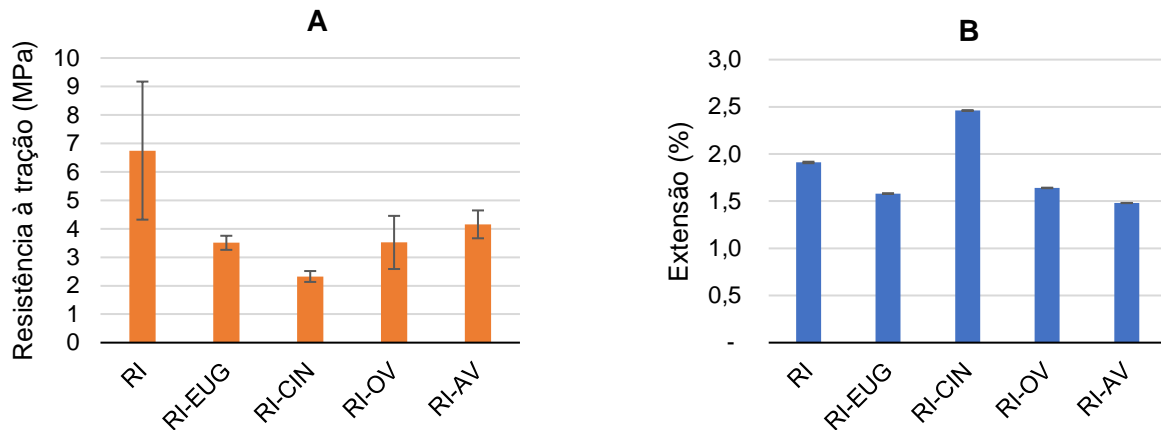
### 3.5. Ensaio de tração

#### 3.5.1. Resistência à tração e extensão máxima

Os ensaios de tração foram realizados de acordo com o ponto 2.8 dos Materiais e Métodos. De modo a obter os valores de resistência à tração máxima e de extensão máxima efetuaram-se gráficos tensão-extensão para cada uma das amostras testadas. Na Figura 33 estão representados os gráficos referentes a 2 ensaios, um de um material mais resistente à tração (Figura 33-A) e outro menos resistente (Figura 33-B). Nesta figura também se entram representados pontos (C e D) que indicam a resistência à tração máxima dos dois materiais.



**Figura 33** – Gráficos tensão-extensão do filme RI (A) e do filme OSEA (B); Pontos da resistência máxima à tração (C e D).



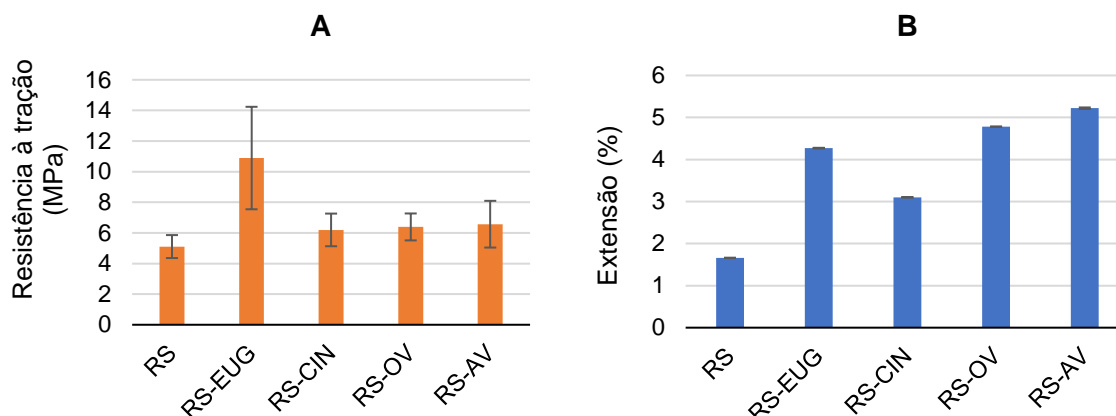
**Figura 34** – Gráfico representativo dos resultados obtidos nos ensaios de resistência à tração dos filmes de resina Anycubic®; **A)** Resistência à tração máxima; **B)** Extensão máxima.

Constatou-se que a resistência à tração nestes filmes é significativamente diminuída com a incorporação dos compostos em estudo (Figura 34 – A). O filme controlo (RI), sem incorporação de composto, apresenta uma resistência à tração de 6,74 MPa, valor este que diminui em todos os filmes dopados, especialmente para o filme incorporado com CIN com um valor de 2,32 MPa significando uma redução de aproximadamente 76%. Para os restantes filmes os valores diminuem em cerca de 49%, 48% e 39% quando incorporados com EUG, OV e AV, respetivamente.

Relativamente aos valores de extensão máxima dos filmes testados a tendência é semelhante à resistência à tração, sendo que em geral os filmes dopados apresentam uma extensão inferior ao filme controlo, com a exceção do filme incorporado com o CIN. O filme de controlo exibe uma extensão de 1,91% que aumenta para os 2,46% no filme incorporado com CIN. Nos restantes filmes verifica-se uma pequena diminuição deste valor para os restantes filmes (OV, EUG e AV). Verifica-se, então, uma menor fragilidade do filme RI-EUG comparativamente ao filme controlo e aos restantes filmes testados produzidos com a resina Anycubic®.

Foram também testados os filmes produzidos com uma mistura de resina Anycubic® e shellac. Pela observação do gráfico (Figura 35 - A) verifica-se uma tendência inversa na resistência à tração comparativamente aos filmes produzidos com a resina Anycubic®. Apesar da resistência à tração do filme de controlo, RS, ser ligeiramente inferior à do filme de controlo RI, com um valor de 5,10 MPa, todos os filmes produzidos com base nesta mistura apresentam valores superiores, especialmente no filme RS- EUG que exibe mais

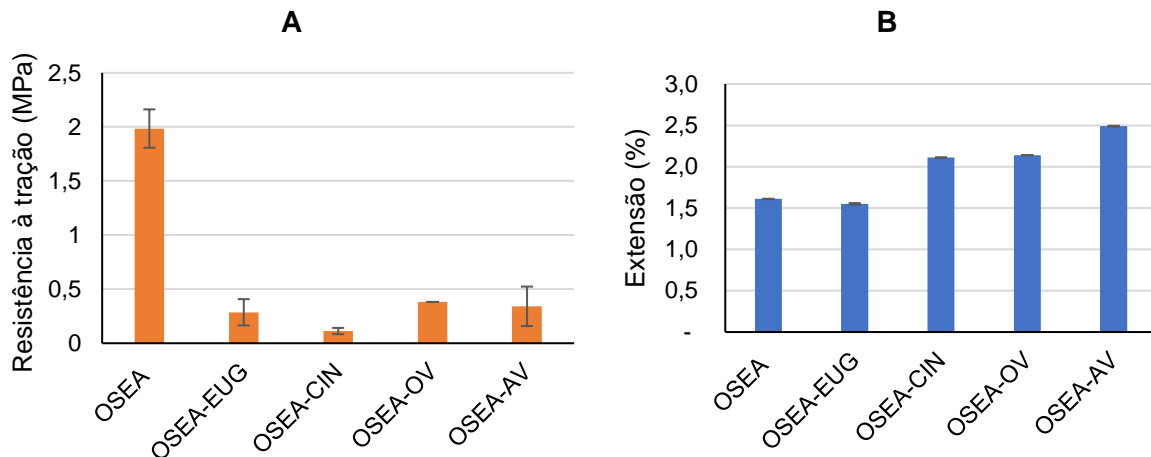
do dobro da resistência, com 10,89 MPa. Os restantes filmes apresentam também valores superiores aos do filme controlo, no entanto com uma menor discrepância entre eles.



**Figura 35** – Gráfico representativo dos resultados obtidos nos ensaios de resistência à tração dos filmes de resina Anycubic® e shellac; **A)** Resistência à tração máxima; **B)** Extensão máxima.

No que diz respeito à extensão máxima (Figura 35 - B) apresentada pelos filmes testados, esta apresenta uma tendência semelhante ao parâmetro anteriormente referido, na qual a incorporação dos compostos leva a um aumento da sua extensão, tornando-os mais adequados para o tipo de aplicações onde estes filmes poderão ser utilizados. O filme controlo apresenta uma extensão de 1,66%, ligeiramente inferior ao filme de resina Anycubic®. O filme com a maior extensão é o dopado com AV, com um valor de 5,22%, ao qual se segue o de OV, EUG e por fim o de CIN.

No caso dos filmes produzidos com resina OSEA, apresentaram uma tendência semelhante aos filmes de resina Anycubic® relativamente à resistência à tração, sendo que os filmes incorporados exibiram valores inferiores aos do filme controlo, OSEA. Estes filmes provaram ser os que apresentam a maior fragilidade comparativamente aos filmes produzidos com as outras 2 bases poliméricas, uma vez que apresentaram valores de resistência à tração muito inferiores e reduzida extensão máxima (Figura 36).



**Figura 36** – Gráfico representativo dos resultados obtidos nos ensaios de resistência à tração dos filmes de resina OSEA; **A)** Resistência à tração máxima; **B)** Extensão máxima.

Relativamente aos dados obtidos para a extensão (Figura 36 – B), verifica-se que a evolução é inversa à obtida para a variação da resistência mecânica, com o filme controlo a apresentar um valor inferior (1,61%) relativamente aos valores encontrados para os filmes dopados (2,11%, 2,14% e 2,49%), com a exceção do filme OSEA-EUG (1,55%).

Comparando as diferentes bases utilizadas, observou-se que os filmes produzidos com a resina OSEA apresentaram os menores valores de resistência à tração comparativamente com os filmes produzidos com as outras bases poliméricas utilizadas. Verificou-se que os filmes dopados que apresentaram os valores mais elevados deste parâmetro foram os filmes produzidos com a mistura de resina Anycubic® e shellac. Relativamente aos valores de extensão, os filmes dopados produzidos com a mistura de resina Anycubic® e shellac foram novamente os que apresentaram os maiores valores deste parâmetro.

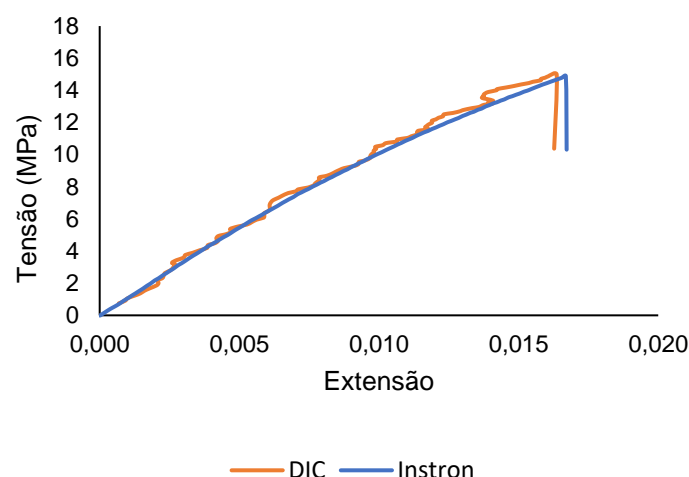
A avaliação geral dos resultados obtidos revela que tanto nos filmes produzidos com resina Anycubic® e shellac como nos produzidos com OSEA, a incorporação dos compostos leva a um aumento da extensão (exceto OSEA-EUG), ou seja, permite um maior alongamento antes da fratura sendo esta uma propriedade mecânica importante para a produção de filmes. Verifica-se ainda que os filmes de resina Anycubic® e shellac são os que apresentam os maiores valores de resistência à extensão tornando-os menos frágeis quando comparados com as outras bases poliméricas utilizadas e assim mais adequados para as aplicações biomédicas dos filmes estudados.

### 3.5.2. Módulo de *Young*

O módulo de *Young* ou módulo de elasticidade ( $E$ ) descreve a rigidez relativa de um material, no qual um material rígido possuirá um módulo de elasticidade elevado e um material flexível um módulo de elasticidade baixo <sup>81</sup>. Numa curva tensão-extensão, que o material apresenta uma região com o comportamento linear é feita a continuação dessa reta por uma tangente e o módulo de *Young* pode ser determinado pela divisão da tensão pela extensão em qualquer ponto desta reta <sup>82</sup>.

Como referido no ponto 2.8 dos Materiais e Métodos, para além dos ensaios de tração realizados no equipamento Instron, utilizou-se o sistema DIC para determinar a deformação dos provetes testados. O sistema DIC apresenta diversas vantagens na determinação de parâmetros como o deslocamento e a extensão dos materiais e é uma tecnologia utilizada para diversos propósitos, nomeadamente para caracterização do comportamento mecânico dos materiais e a identificação de algumas constantes inerentes aos mesmos, onde se inclui o módulo de *Young*<sup>76</sup>.

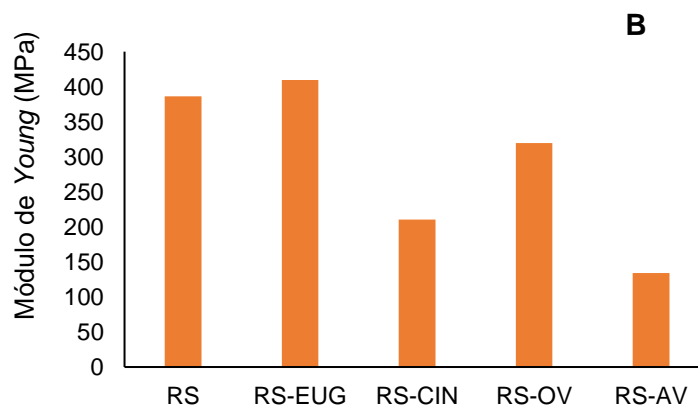
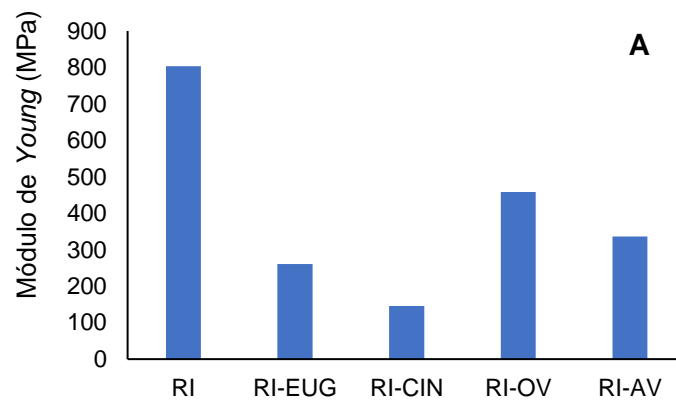
Foram então obtidos os gráficos tensão-extensão com e sem a utilização do sistema DIC. Uma das grandes vantagens deste sistema é o facto de este medir o deslocamento de pontos que se encontram no provete, conseguidos pela aplicação de tinta branca e preta nos mesmos, enquanto o ensaio de tração realizado sem esta tecnologia nos apresenta o deslocamento entre as amarras do equipamento. No entanto, ao analisar ambas as curvas tensão-extensão obtidas, verifica-se que a diferença entre elas é pouco significativa, como se pode observar no gráfico apresentado na Figura 37.

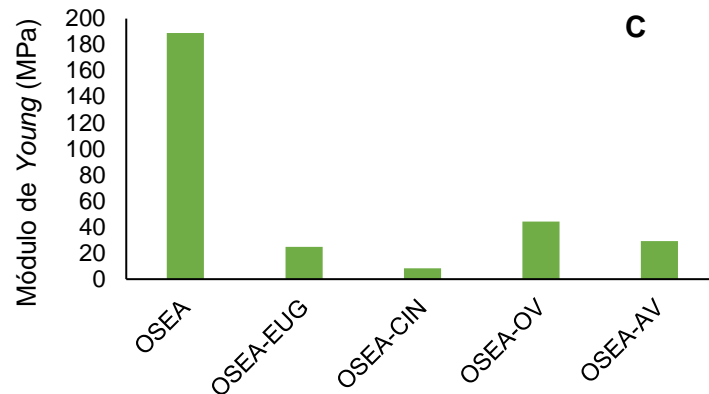


**Figura 37** – Gráfico representativo das curvas tensão-extensão do filme RS-EUG, com e sem o sistema DIC.

Foram então obtidas as curvas para todos os provetes utilizados e determinado o módulo de *Young* para cada um dos filmes produzidos. Na Figura 38 estão apresentados os valores do módulo de *Young* obtidos para cada um dos filmes produzidos.

Pela observação dos valores apresentados neste gráfico verifica-se que, com era espectável, os filmes produzidos apresentaram valores do módulo de *Young* elevados, demonstrando a sua elevada resistência quando se aplica um deslocamento. À semelhança do que acontece com a resistência à tração previamente apresentada, os valores do módulo de *Young* são superiores para o filme controlo RI (803 MPa), seguido do filme RS (368 MPa) e por fim o filme de OSEA (189 MPa).



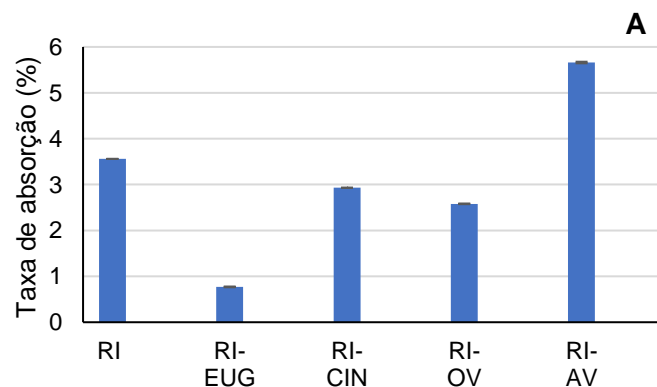


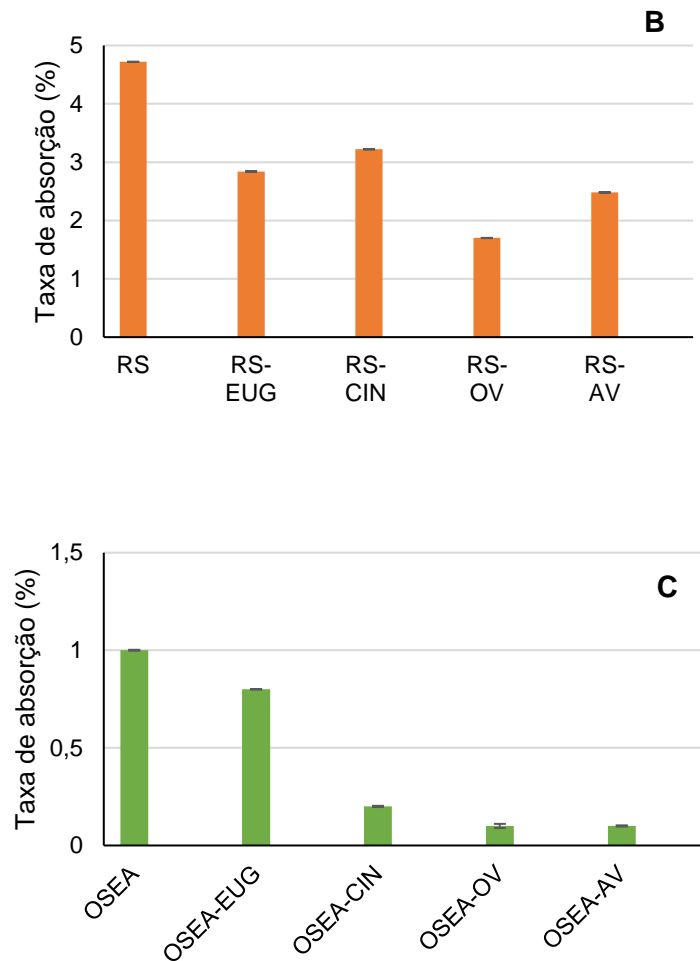
**Figura 38** – Módulo de *Young* dos filmes de resina Anycubic **(A)**, resina Anycubic® e shellac **(B)** e resina OSEA **(C)**.

Percebe-se ainda que, geralmente, com a incorporação dos compostos nos filmes, estes apresentaram valores de módulo inferiores aos filmes controle, ou seja, adquiriram alguma elasticidade mesmo que pouco evidente, especialmente nos filmes produzidos com a resina OSEA. Constata-se que estes gráficos seguem na sua maioria a tendência apresentada pelos gráficos de resistência à tração respectivos apresentados no ponto anterior.

### 3.6. Ensaios de absorção de água

Os ensaios de absorção de água foram realizados de acordo com o descrito no ponto 2.5 dos Materiais e Métodos, e os resultados apresentados na Figura 39. Este ensaio teve como objetivo quantificar a percentagem de água absorvida pelas amostras dos filmes produzidos. Esta é uma propriedade importante uma vez que indica a capacidade de hidratação dos polímeros característica que está relacionada com a libertação os compostos incorporados.





**Figura 39** – Taxa de absorção de água dos filmes de resina Anycubic (A), resina Anycubic® e shellac (B) e resina OSEA (C), após 24h.

Pela observação dos resultados representados na Figura 39, verifica-se que independentemente da matriz polimérica utilizada, na generalidade, existiu uma tendência para a diminuição da taxa de absorção de água nos filmes incorporados com os compostos em estudo relativamente aos respetivos filmes controlo. Os filmes produzidos com resina Anycubic® e com a mistura de resina Anycubic® e shellac apresentaram os maiores valores de absorção, quer nos filmes controlo quer nos filmes incorporados.

Nos filmes de resina Anycubic®, o filme controlo (RI) apresentou uma taxa de absorção de água de 3,6% e a incorporação dos compostos levou à sua diminuição em todos os filmes com a exceção do filme RI-AV (5,7%). No que diz respeito aos filmes produzidos com a mistura de resinas (Anycubic® e shellac) o filme controlo, RS, apresentou o maior valor (4,7%), com valores de absorção crescentes de acordo com a sequência: OV, AV, EUG e CIN. Os filmes produzidos com a resina OSEA são os que apresentaram menores taxas de absorção, com o filme controlo (OSEA) com um valor de 1% e o filme OSEA-OV com apenas 0,1% de absorção.

### 3.7. Produção de peças 3D

#### 3.7.1. Peças 3D de resina Anycubic®

As peças de resina Anycubic® foram produzidas numa impressora de DLP, através da cura UV. Os parâmetros de impressão foram alterados de modo a imprimir as peças com o maior rigor possível. Esta resina tem indicação dos limites dos parâmetros como está representado na Tabela 8.

**Tabela 8** – Parâmetros para impressão de peças 3D de resina Anycubic®<sup>69</sup>.

Parâmetro	Valores recomendados
Camadas inferiores	5 - 10
Tempo de exposição das camadas inferiores	60-80 s
Tempo de exposição normal	8-10 s

Como já foi referido foram desenhadas peças 3D com diâmetros de 1 e 1,5 cm e alturas de 0,2 e 0,5 cm, num total de 4 peças distintas que estão discriminadas na Tabela 9. Na tabela 10 estão apresentados os códigos atribuídos a cada uma das peças produzidas.

**Tabela 9** – Dimensões das peças 3D

	Diâmetro (cm)	Altura (cm)
Peça 1	1,5	0,5
Peça 2	1	0,5
Peça 3	1,5	0,2
Peça 4	1	0,2

**Tabela 10** – Códigos das peças 3D produzidas

Filmes		
Base Polimérica	Composto	Código
Resina Anycubic®	10% de EUG	PRI-EUG
	10% de CIN	PRI-CIN
	10% de OV	PRI-OV
	10% de AV	PRI-AV
Resina OSEA	10% de EUG	POSEA-EUG
	10% de CIN	POSEA-CIN
	10% de OV	POSEA-OV
	10% de AV	POSEA-AV

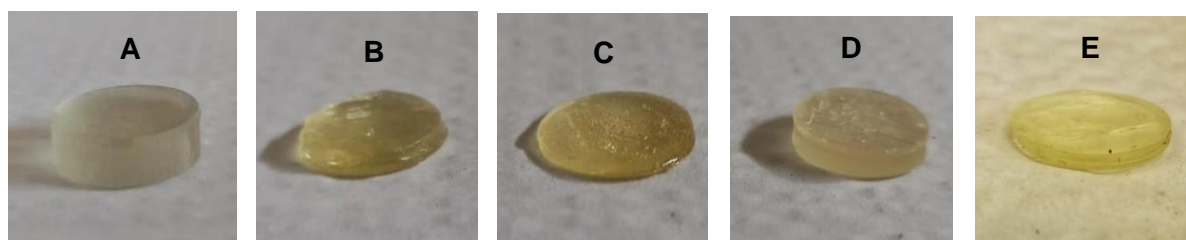
Ao imprimir as peças com a resina Anycubic® estas dimensões foram atingidas através do ajuste dos parâmetros recomendados. Neste caso foram usados os seguintes valores:

- Camadas inferiores: 6
- Tempo de exposição das camadas inferiores: 40s
- Tempo de exposição normal: 10 a 12s

Após várias tentativas de impressão determinou-se que estes eram os valores que produziam peças de maior qualidade e com as dimensões pretendidas. De seguida, procedeu-se à impressão das peças incorporadas com os compostos antimicrobianos seleccionados, numa quantidade de 10% (m/m) em relação à massa de resina utilizada. Tal como na preparação dos filmes dopados, os compostos foram dissolvidos em etanol e incorporados na resina. Verificou-se que não foi possível utilizar os parâmetros seleccionados para a produção de peças dopadas pelo que houve necessidade de ajustar novamente os parâmetros de impressão aumentando os tempos de exposição de acordo com o seguinte:

- Camadas inferiores: 6
- Tempo de exposição das camadas inferiores: 55 a 60s
- Tempo de exposição normal: 10 a 15s

Verifica-se que apesar do aumento dos tempos de exposição ainda assim as peças impressas não ficaram com as medidas pretendidas relativamente às medidas das peças produzidas sem os compostos. As peças com CIN, EUG, AV e OV apresentam uma maior fragilidade e fragmentam-se com facilidade. Na Figura 40 estão apresentadas as diferentes peças realizadas com incorporação dos compostos em estudo, onde se consegue perceber as diferenças entre a peças modelo (**A**) e as peças dopadas (**B**, **C**, **D** e **E**).



**Figura 40** – Peças 3D de resina Anycubic®; **A)** Peça 1; **B)** PRI-CIN; **C)** PRI-EUG; **D)** PRI-AV; **E)** PRI-OV.

Na Figura 40 é possível verificar as diferenças entre a peça modelo e as peças dopadas, constata-se que a peça PRI-AV (Figura 40 – D) é a que apresenta um aspeto mais semelhante à peça controlo, no entanto não atinge as medidas pretendidas. Apesar de todas apresentarem o diâmetro desejado, exibem alturas diferentes entre elas e nenhuma o valor desejado. O diâmetro e a altura de cada peça encontram-se apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** – Dimensões das peças 3D de resina Anycubic® dopadas com os compostos em estudo.

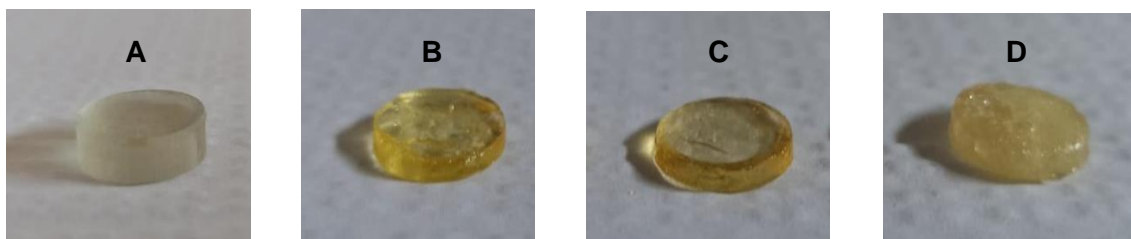
		PRI-EUG	PRI-CIN	PRI-AV	PRI-OV
<b>Peça 1</b>	Diâmetro (cm)	1,50	1,50	1,50	1,50
	Altura (cm)	0,20	0,24	0,30	0,20
<b>Peça 2</b>	Diâmetro (cm)	1,00	1,00	1,00	1,00
	Altura (cm)	0,20	0,20	0,20	0,15
<b>Peça 3</b>	Diâmetro (cm)	1,50	1,50	1,50	1,50
	Altura (cm)	0,10	0,13	0,16	0,10
<b>Peça 4</b>	Diâmetro (cm)	1,00	1,00	1,00	1,00
	Altura (cm)	0,10	0,11	0,16	0,10

### 3.7.2. Peças 3D de resina OSEA

Adicionalmente às peças de resina Anycubic®, a resina apropriada para a impressão 3D, foram impressas, também, peças com a resina OSEA com o fotoiniciador selecionado. Devido à natureza da mistura foi necessário ajustar, novamente, os parâmetros de impressão, uma vez que os utilizados na produção de peças de resina Anycubic, não permitiu obter quaisquer peças com a resina OSEA. Assim o processo foi otimizado por alteração dos parâmetros principais até que foi possível produzir peças 3D com os seguintes parâmetros:

- Camadas inferiores: 6
- Tempo de exposição das camadas inferiores: 70 a 75s
- Tempo de exposição normal: 16 a 18s

Tal como nos filmes dopados, as peças foram produzidas com quantidades de composto de 10% (m/m) relativamente à massa de resina utilizada. A quantidade de fotoiniciador usada foi superior à utilizada nos filmes, visto que com 0,5% do fotoiniciador não foi possível produzir peças integras, tendo sido utilizada uma quantidade de 1% (m/m). À semelhança das peças de resina Anycubic® dopadas, as peças de resina OSEA não apresentaram as medidas desejadas, sugerindo novamente que a interação entre a resina e os compostos provoca alterações nas propriedades mecânicas da mesma. As peças apresentaram uma fragilidade maior comparativamente às peças produzidas com resina Anycubic®, com tendência para quebrar facilmente a meio no decorrer do processo de impressão, ficando parte da peça aderida ao tanque e a restante parte na peça móvel, não atingindo assim a altura desejada (Figura 41). Não foi possível imprimir peças dopadas com OV.



**Figura 41** – Peças 3D de resina Anycubic®; **A)** Peça 1; **B)** POSEA-CIN; **C)** POSEA-EUG; **D)** POSEA-AV.

Analisando as imagens da Figura 41 é perceptível a desigualdade da altura nas diferentes peças impressas. Contrariamente às peças produzidas com a resina Anycubic®,

que apresentavam o diâmetro pretendido, algumas das peças de resina OSEA exibiram um diâmetro ligeiramente inferior ao valor projetado. Com esta resina só foi possível imprimir as peças 1 e 2 uma vez que as peças com uma altura inferior acabavam por se desfazer todas uma vez que ficavam muito finas. Mais uma vez a peça que apresentou os valores de altura mais aproximados da peça pretendida foi a peça incorporada com o AV, como se pode verificar na Tabela 12.

**Tabela 12** – Dimensões das peças 3D de resina OSEA dopadas com os compostos em estudo.

		<b>POSEA-EUG</b>	<b>POSEA-CIN</b>	<b>POSEA-AV</b>
<b>Peça 1</b>	Diâmetro (cm)	1,45	1,40	1,40
	Altura (cm)	0,21	0,20	0,26
<b>Peça 2</b>	Diâmetro (cm)	1,00	1,00	1,00
	Altura (cm)	0,20	0,20	0,30

## 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho teve como objetivo a produção de materiais híbridos biocompatíveis, com base em resinas derivadas do óleo de soja com potenciais propriedades antimicrobianas. Para esse fim foram produzidos filmes e peças 3D incorporados com 4 compostos derivados de produtos naturais: EUG, CIN, OV e AV. Os filmes foram produzidos com 3 bases poliméricas distintas designadamente i) resina Anycubic®, ii) uma mistura de resina Anycubic® e shellac (75:25%) e iii) resina OSEA. Produziram-se também peças 3D de resina Anycubic® e de resina OSEA.

De modo a avaliar as propriedades antimicrobianas dos compostos e filmes incorporados foram realizados ensaios microbiológicos, num teste de *soft-agar*. Constatou-se que todos os compostos naturais utilizados apresentavam atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva (*S.aureus*) e Gram-negativa (*E.coli*), enquanto os filmes controlo, sem compostos incorporados, não apresentavam qualquer atividade antimicrobiana, pelo que se pode afirmar que a atividade apresentada pelos filmes incorporados resultou da difusão dos compostos da matriz polimérica. Na generalidade os filmes incorporados apresentaram uma maior atividade antibacteriana contra a *S.aureus*. Verificou-se que todos os filmes dopados com CIN apresentaram os melhores resultados em todas as bases utilizadas e que os filmes produzidos com resina OSEA são os que apresentaram melhor atividade antibacteriana.

Foi feita a caracterização química e mecânica dos materiais híbridos produzidos. Quando analisados os espectros FTIR-ATR, de uma maneira geral, os espectros dos filmes incorporados, não apresentam diferenças significativas relativamente ao espectro do filme controlo, para cada grupo, uma vez que 90% do material do filme é composto pela base polimérica. Ainda assim, foi possível identificar a presença dos compostos ativos incorporados, mas não foi possível verificar a existência de novas ligações entre as matrizes utilizadas e os compostos incorporados. No que diz respeito aos ensaios de absorção de água, verificou-se que as taxas de absorção são reduzidas em todas as matrizes poliméricas, especialmente nos filmes produzidos com a resina OSEA, e que de uma forma geral a incorporação dos compostos leva à redução da percentagem de absorção de água.

Realizaram-se estudos de libertação controlada, nos quais os perfis de libertação dos compostos foram obtidos em etanol ao longo de 24 h, por espectroscopia de UV-Vis. Constatou-se que os perfis de libertação variam de acordo com a base polimérica utilizada para a produção dos filmes. Nos filmes produzidos com resina Anycubic® a libertação segue uma tendência linear com percentagens de libertação baixas nas primeiras horas de ensaio

que sobem progressivamente os 90% ao fim das 24 h, em 3 dos filmes testados. No caso dos filmes produzidos com a mistura de resina Anycubic® e shellac (75:25%) observaram-se dois comportamentos de libertação diferentes, com dois dos filmes (RS-EUG e RS-CIN) a atingir uma percentagem de libertação elevada no fim das 4 h iniciais de ensaio que aumentam nas 24 h, atingindo valores perto dos 100% e outros dois filmes (RS-OV e RS-AV) com libertações mais reduzidas quer nas primeiras horas quer no final das 24 h. Os perfis de libertação dos filmes de resina OSEA incorporados apresentaram uma tendência exponencial em todos os filmes tendo os filmes OSEA-EUG e OSEA-AV apresentado maiores percentagens de libertação.

Relativamente aos ensaios de tração os resultados diferem consoante a matriz utilizada nas amostras testadas. Nos filmes de resina Anycubic® e nos de resina OSEA, a incorporação dos compostos leva, geralmente, à diminuição da resistência à tração, enquanto os filmes de mistura de resina Anycubic® e shellac (75:25%) apresentam uma tendência oposta. No que diz respeito à extensão, os filmes de mistura de resina Anycubic® e shellac e os de resina OSEA apresentam uma tendência de diminuição da mesma com a incorporação dos compostos, sendo que o contrário acontece para os filmes de resina Anycubic®.

No processo de impressão das peças 3D, percebeu-se que a incorporação dos compostos na resina Anycubic® altera as características das peças produzidas, uma vez que estas não atingem as medidas pretendidas, que foram definidas para as peças modelo. Conseguiu-se ainda imprimir peças com a resina OSEA com a incorporação de 1% do fotoiniciador selecionado, uma vez não se tratar de uma resina adequada para o processo de cura por radiação UV. Tal como as peças de resina Anycubic®, as peças incorporadas não apresentaram as medidas pretendidas, apesar da alteração dos parâmetros de impressão. Não foi possível a impressão de peças com a mistura de resina Anycubic® com shellac consequência da elevada temperatura necessária para dissolução do shellac, pois uma vez retirada a mistura do calor esta solidifica muito rapidamente não permitindo a cura por UV pela impressora no tempo estabelecido.

Como perspetivas futuras sugere-se a avaliação contra outras estirpes de bactérias de forma a validar os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos e aumentar o espectro de bactérias estudadas permitindo direcionar estes materiais para diferentes aplicações.

Sugere-se ainda testar a incorporação de outros produtos naturais com atividade antimicrobiana comprovada. Testar os ensaios de libertação mimetizando o meio fisiológico (tampão PBS pH 7,4) de forma a validar o modelo de libertação em outros meios.

Outra sugestão passa pela impressão 3D de mais peças incorporadas com os compostos já estudados e outros novos compostos, de modo a ser possível produzir peças de maior qualidade e no caso da resina OSEA com menores quantidades do fotoiniciador.

Uma parte dos resultados deste trabalho foram apresentados como comunicação em poster em duas conferências internacionais:

Inês Amaral, Mariana Patornilo, Ivo Bragança, Ana Catarina Sousa. 2022. “Development of soybean-based mixtures for 3D printing of antimicrobial materials”. International Chemistry Conference, Chemeet, 27-29 de junho de 2022, evento online.

Elisabeth Ekoh, Inês Amaral, Sónia Martins, Ivo Manuel Bragança, Ana Catarina Sousa. 2022. “Selection of conventional photoinitiators to produce biocompatible UV epoxidized soybean oil resin mixtures for 3D printing technology”. The 3<sup>rd</sup> International Electronic Conference on Applied Sciences. 1 a 15 de dezembro, evento online.

## 5. Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance [internet]. 2021 [cited 2022 July 28]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022 Feb 12;399(10325):629-55. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
3. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016 Apr;6(2):71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
4. Gandhi KJ, Deshmane SV, Biyani KR. Polymers in pharmaceutical drug delivery system: A review. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2012;14(2):57-66.
5. Rajak DK, Pagar DD, Kumar R, Pruncu CI. Recent progress of reinforcement materials: A comprehensive overview of composite materials. *J Mater Res Technol*. 2019;8(6):6354-6374. doi:10.1016/j.jmrt.2019.09.068
6. Borandeh S, Bochove BV, Teotia A, Seppälä J. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021 Jun;173:349-373. doi:10.1016/j.addr.2021.03.022
7. Kalyan BG, Kumar L. 3D Printing: Applications in Tissue Engineering, Medical Devices, and Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2022 Mar 17;23(4):1-20. doi:10.1208/s12249-022-02242-8
8. Kafle A, Luis E, Silwal R, Pan HM, Shrestha PL, Bastola AK. 3D/4D Printing of Polymers: Fused Deposition Modelling (FDM), Selective Laser Sintering (SLS), and Stereolithography (SLA). *Polymers (Basel)*. 2021 Sep 15;13(18):1-37. doi:10.3390/polym13183101
9. Park BJ, Choi HJ, Moon SJ, Kim SJ, Bajracharya R, Min JY, et al. Pharmaceutical applications of 3D printing technology: current understanding and future perspectives. *J Pharm Investig*. 2019;49(6):575-585. doi:10.1007/s40005-018-00414-y
10. Miao S, Zhu W, Castro NJ, Nowicki M, Zhou X, Cui H, et al. 4D printing smart biomedical scaffolds with novel soybean oil epoxidized acrylate. *Sci Rep*. 2016 Jun 2;6:1-10. doi:10.1038/srep27226
11. Abushaheen MA, Muzaaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al.

- Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis Mon.* 2020 Jun;66(6):1-21. doi:10.1016/j.disamonth.2020.100971
12. Collignon PJ, McEwen SA. One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Trop Med Infect Dis.* 2019 Jan 29;4(1):1-21. doi:10.3390/tropicalmed4010022
  13. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol.* 2020 Jan;88(1):26-40. doi:10.1007/s00239-019-09914-3
  14. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2020 Oct;30(4):619-635. doi:10.1016/j.giec.2020.06.004
  15. Jain KK. An Overview of Drug Delivery Systems. *Methods Mol Biol.* 2020;2059:1-54. doi:10.1007/978-1-4939-9798-5\_1
  16. Adepu S, Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules.* 2021 Sep 29;26(19):1-45. doi:10.3390/molecules26195905
  17. Paolini MS, Fenton OS, Bhattacharya C, Andresen JL, Langer R. Polymers for extended-release administration. *Biomed Microdevices.* 2019 Apr 8;21(2):45;1-24. doi: 10.1007/s10544-019-0386-9
  18. Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for drug delivery systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2010;1:149-173. doi:10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847
  19. Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F. Polymers and Drug Delivery Systems. *Curr Drug Deliv.* 2012 Jul;9(4):367-94. doi:10.2174/156720112801323053
  20. Paarakh MP, Jose PA, Setty CM, Peter GV. Release Kinetics – Concepts and Applications. *Int J Pharm Res Technol.* 2018;8(1):12–20.
  21. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(3):217–23.
  22. Singh M, Pilani S. Review: In vitro Drug Release Characterization Models. *Int J Pharm Stud Res.* 2021;2:77–84
  23. Hsissou R, Seghiri R, Benzekri Z, Hilali M, Rafik M, Elharfi A. Polymer composite materials: A comprehensive review. *Compos Struct.* 2021;262:1-15.

doi:10.1016/j.compstruct.2021.113640.

24. Doppalapudi S, Jain A, Khan W, Domb AJ. Biodegradable polymers-an overview. *Polym Adv Technol*. 2014 Apr;25(5):427-35. doi:10.1002/pat.3305
25. Alizadeh-Osgouei M, Li Y, Wen C. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioact Mater*. 2019 Nov 27;4(1):22-36. doi:10.1016/j.bioactmat.2018.11.003
26. Collin G, Mildenberg R, Zander M, Höke H, McKillip W, Freitag W, Imöhl W. Resins, Synthetic. In: Ullmann, F, editors. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th edition. Wiley. 2011. p.495-519.
27. Kyei SK, Eke WI, Darko G, Akaranta O. Natural polyhydroxy resins in surface coatings: a review. *J Coatings Technol Res*. 2022 Mar 22;19(3):775-794. doi:10.1007/s11998-021-00604-8
28. Chiavari G, Fabbri D, Prati S. Characterisation of natural resins by pyrolysis - Silylation. *Chromatographia*. 2002;55(9-10):611-616. doi:10.1007/BF02492910
29. Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis AL. Natural Resins and Bioactive Natural Products thereof as Potential Antimicrobial Agents. *Curr Pharm Des*. 2012;17(13):1267-1290. doi:10.2174/138161211795703807
30. Yin H, Zheng P, Zhang E, et al. An environmentally-friendly soybean based resin as an alternative to formaldehyde-based counterpart for biomass composites. *Int J Adhes Adhes*. 2021 Jan;104:1-8. doi:10.1016/j.ijadhadh.2020.102755
31. Hu Y, Jia P, Shang Q, Zhang M, Feng G, Liu C, et al. Synthesis and Application of UV-curable Phosphorous-containing Acrylated Epoxidized Soybean Oil-based Resins. *J Bioresour Bioprod*. 2019 Aug;4(3):183-191. doi:10.12162/jbb.v4i3.007
32. Wu Q, Hu Y, Tang J, et al. High-Performance Soybean-Oil-Based Epoxy Acrylate Resins: "green" Synthesis and Application in UV-Curable Coatings. *ACS Sustain Chem Eng*. 2018;6(7):8340-8349. doi:10.1021/acssuschemeng.8b00388
33. Tang J, Zhang J, Lu J, Huang J, Zhang F, Hu Y, et al. Preparation and Properties of Plant-Oil-Based Epoxy Acrylate-Like Resins for UV-Curable Coatings. *Polymers (Basel)*. 2020 Sep 22;12(9):1-16. doi:10.3390/POLYM12092165
34. Tang Q, Li Q, Luo Y, Pan X, Xi Z, Zhao L. Development of an Innovative Biobased UV Coating Synthesized from Acrylated Epoxidized Soybean Oil and

- Poly(octamethylene maleate (anhydride) citrate). *Ind Eng Chem Res.* 2021 Jun 28;60(27):9797-9806. doi:10.1021/acs.iecr.1c01258
35. Cui Y, Yang J, Lei D, Su J. 3D Printing of a Dual-Curing Resin with Cationic Curable Vegetable Oil. *Ind Eng Chem Res.* 2020 Jun 12;59(25):11381-11388. doi:10.1021/acs.iecr.0c01507
  36. Yuan Y, He N, Xue Q, Guo Q, Dong L, Haruna MH, et al. Shellac: A promising natural polymer in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 2021;109:139-153. doi:10.1016/j.tifs.2021.01.031
  37. Thombare N, Kumar S, Kumari U, Sakare P, Yogi RK, Prasad N, et al. Shellac as a multifunctional biopolymer: A review on properties, applications and future potential. *Int J Biol Macromol.* 2022 Aug;215:203-223. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.06.090
  38. Yuan Y, He N, Dong L, Guo Q, Zhang X, Li B, et al. Multiscale Shellac-Based Delivery Systems: From Macro: From Nanoscale. *ACS Nano.* 2021;15(12):18794-18821. doi:10.1021/acsnano.1c07121
  39. Jamróz W, Szafraniec J, Kurek M, Jachowicz R. 3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges. *Pharm Res.* 2018 Jul 11;35(9):1-22. doi:10.1007/s11095-018-2454-x
  40. Mathew E, Pitzanti G, Larrañeta E, Lamprou DA. 3D printing of pharmaceuticals and drug delivery devices. *Pharmaceutics.* 2020 Mar 15;12(3):1-9. doi:10.3390/pharmaceutics12030266
  41. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials.* 2010 Aug;31(24):6121-6130. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.050
  42. Aguilar-De-leyva Á, Linares V, Casas M, Caraballo I. 3D Printed Drug Delivery Systems Based on Natural Products. *Pharmaceutics.* 2020 Jul 3;12(7):1-20. doi:10.3390/pharmaceutics12070620
  43. Agueda JR, Chen Q, Maalihan RD, Ren J, Silva IG, Dugos NP, et al. 3D printing of biomedically relevant polymer materials and biocompatibility. *MRS Commun.* 2021;11(2):197-212. doi:10.1557/s43579-021-00038-8
  44. Ligon SC, Liska R, Stampfl J, Gurr M, Mülhaupt R. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chem Rev.* 2017 Aug 9;117(15):10212-10290. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00074

45. Melander RJ, Basak AK, Melander C. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Nat Prod Rep*. 2020 Nov 1;37(11):1454-1477. doi: 10.1039/d0np00022a
46. Martelli G, Giacomini D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *Eur J Med Chem*. 2018 Oct 5;158:91-105. doi:10.1016/j.ejmech.2018.09.009
47. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*. 2019 Jun;24(11):1-21.
48. Solórzano-Santos F, Miranda-Navales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*. 2012 Apr;23(2):136-41. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.005
49. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog*. 2019 Sep;134:103580. doi:10.1016/j.micpath.2019.103580
50. Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(10):1320-1323. doi:10.1080/10408398.2012.692127
51. Mutlu-Ingok A, Devecioglu D, Dikmetas DN, Karbancioglu-Guler F, Capanoglu E. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. *Molecules*. 2020 Oct 14;25(20):1-49. doi:10.3390/molecules25204711
52. Ramsey JT, Shropshire BC, Nagy TR, Chambers KD, Li Y, Korach KS. Essential oils and health. *Yale J Biol Med*. 2020 Jun 29;93(2):291-305.
53. Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen*. 2017;6(4):1-6. doi:10.1002/mbo3.459
54. Basavegowda N, Baek KH. Synergistic Antioxidant and Antibacterial Advantages of Essential Oils for Food Packaging Applications. *Biomolecules*. 2021 Sep 2;11(9):1-18. doi:10.3390/biom11091267
55. Albano M, Crulhas BP, Alves FCB, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of

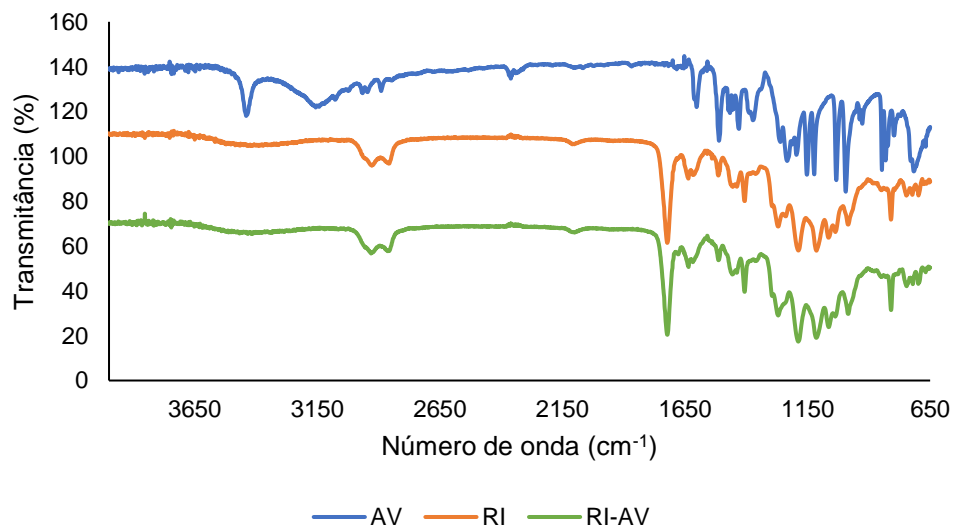
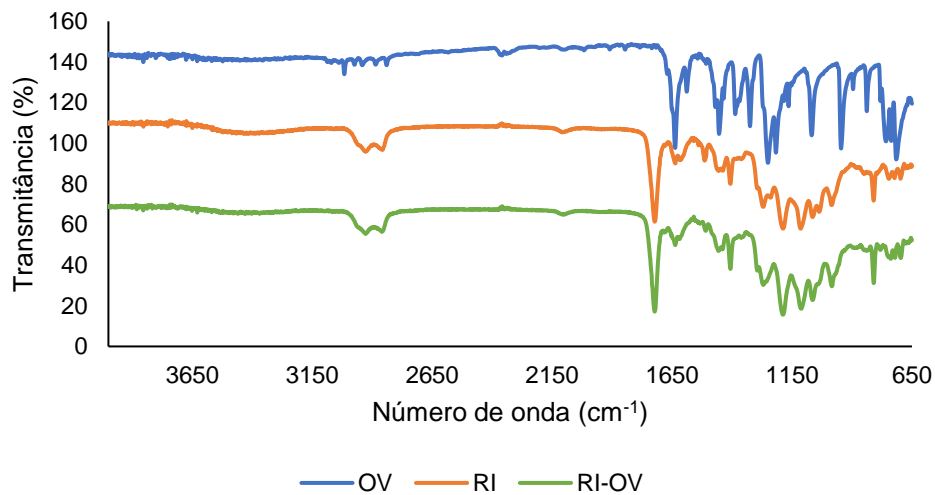
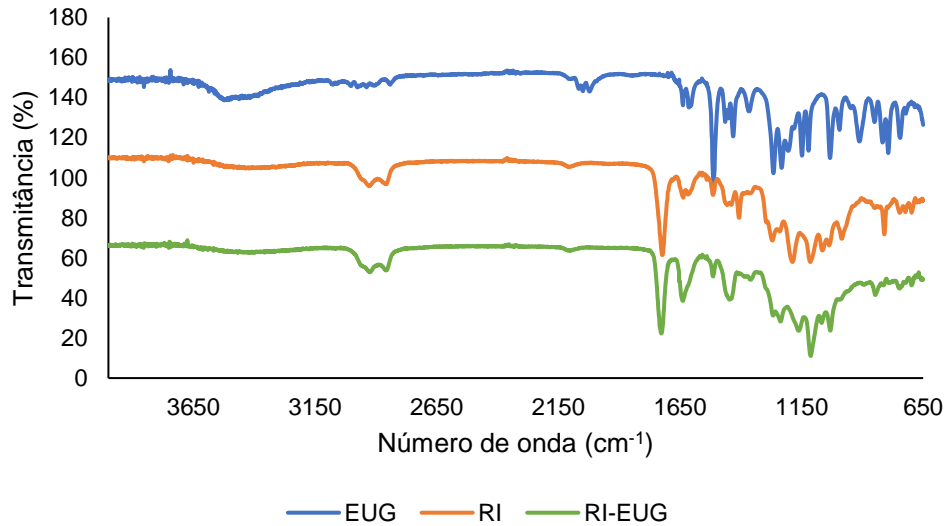
- cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microb Pathog*. 2019 Jan;126:231-238. doi:10.1016/j.micpath.2018.11.009
56. Yu C, Li YL, Liang M, et al. Characteristics and hazards of the cinnamaldehyde oxidation process. *RSC Adv*. 2020;10(32):19124-19133. doi:10.1039/c9ra10820c
  57. He Z, Huang Z, Jiang W, Zhou W. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Front Microbiol*. 2019 Sep 25;10:1-11. doi:10.3389/fmicb.2019.02241
  58. Cox HJ, Li J, Saini P, Paterson JR, Sharples GJ, Badyal JPS. Bioinspired and eco-friendly high efficacy cinnamaldehyde antibacterial surfaces. *J Mater Chem B*. 2021;9(12):2918-2930. doi:10.1039/d0tb02379e
  59. Ulanowska M, Olas B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr;22(7):1-13. doi:10.3390/ijms22073671
  60. Nisar MF, Khadim M, Rafiq M, Chen J, Yang Y, Wan CC. Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Aug 3;2021:1-14. doi:10.1155/2021/2497354
  61. Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. *Molecules*. 2012 Jun 6;17(6):6953-81. doi: 10.3390/molecules17066953
  62. Silva FFM, Monte FJQ, Lemos TLG, Nascimento PGG, Costa AKM, Paiva LMM. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. *Chem Cent J*. 2018 Apr 3;12(1):1-9. doi:10.1186/s13065-018-0407-4
  63. Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Crit Rev Microbiol*. 2017 Nov;43(6):668-689. doi:10.1080/1040841X.2017.1295225
  64. Ashrafudoulla M, Mizan MFR, Ha AJ, Park SH, Ha S. Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiol*. 2020 Oct;91:1-13. doi:10.1016/j.fm.2020.103500
  65. Arya SS, Rookes JE, Cahill DM, Lenka SK. Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *Adv Tradit Med*. 2021;21(3):415-431. doi:10.1007/s13596-020-00531-w
  66. Banerjee G, Chattopadhyay P. Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *J*

- Sci Food Agric.* 2019 Jan 30;99(2):499-506. doi:10.1002/jsfa.9303
67. Walton NJ, Mayer MJ, Narbad A. Vanillin. *Phytochemistry.* 2003 Jul;63(5):505-515. doi:10.1016/S0031-9422(03)00149-3.
  68. Olatunde A, Mohammed A, Ibrahim MA, Tajuddeen N, Shuaibu MN. Vanillin: A food additive with multiple biological activities. *Eur J Med Chem Reports.* 2022 Aug;5:1-16. doi:10.1016/j.ejmcr.2022.100055
  69. Anycubic. Anycubic Plant-based UV Eco-Resin [internet]. [cited 2022. Aug 8]. Available from: <https://www.anycubic.com/collections/plant-based-uv-resin/products/anycubic-plant-based-uv-resin-3-6kg-package>.
  70. Hockett KL, Baltrus DA. Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. *J Vis Exp.* 2017 Jan 14;2017(119):1-5. doi:10.3791/55064
  71. Fernandes TA, Costa IFM, Jorge P, Sousa AC, André V, Cerca N, et al. Silver(I) Coordination Polymers Immobilized into Biopolymer Films for Antimicrobial Applications. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021 Mar 24;13(11):12836-12844. doi:10.1021/acsami.0c19446.
  72. Dhakal HN, Zhang ZY, Richardson MOW. Effect of water absorption on the mechanical properties of hemp fibre reinforced unsaturated polyester composites. *Compos Sci Technol.* 2007 Jun;67(7-8):1674-1683. doi:10.1016/j.compscitech.2006.06.019
  73. Rocha FS, Gomes AJ, Lunardi CN, Kaliaguine S, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. *Can J Chem Eng.* 2018;96(12):2512-2517. doi:10.1002/cjce.23344
  74. Barrios VAE, Méndez JRR, Aguilar NVP, Espinosa GA, Rodríguez JLD. FTIR - An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. In: Theophanides T, editor. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology.* Books on Demand; 2012. p.196-212.
  75. Urbaniak-Domagala W. The Use of the Spectrometric Technique FTIR-ATR to Examine the Polymers Surface. In: Farrukh MA, editor. *Advanced Aspects of Spectroscopy.* 2012. p.85-104.
  76. Pan B. Digital image correlation for surface deformation measurement: Historical developments, recent advances and future goals. *Meas Sci Technol.* 2018;29(8):1-

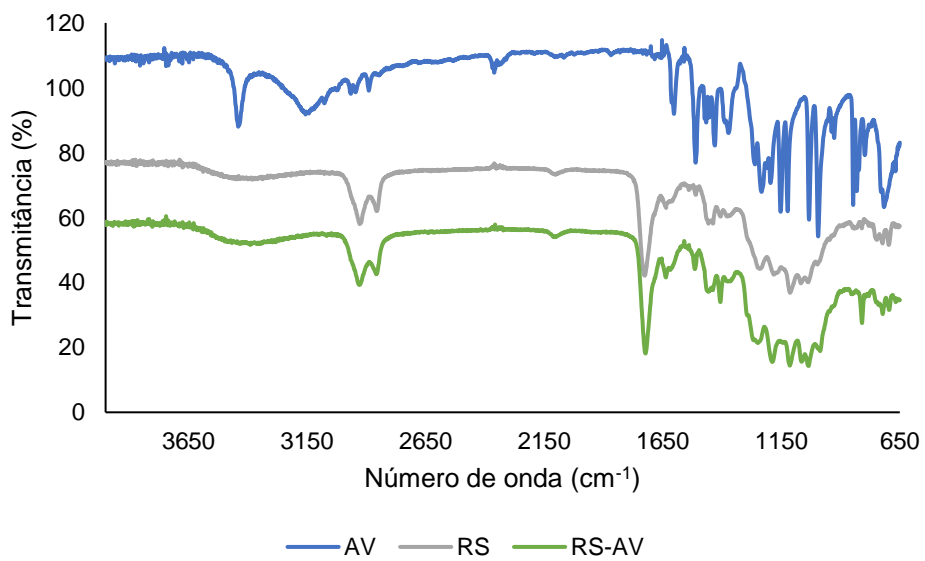
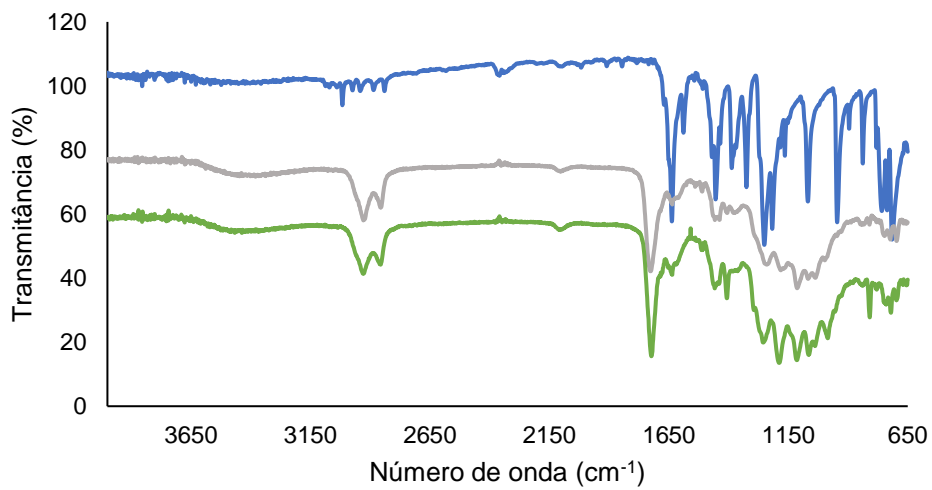
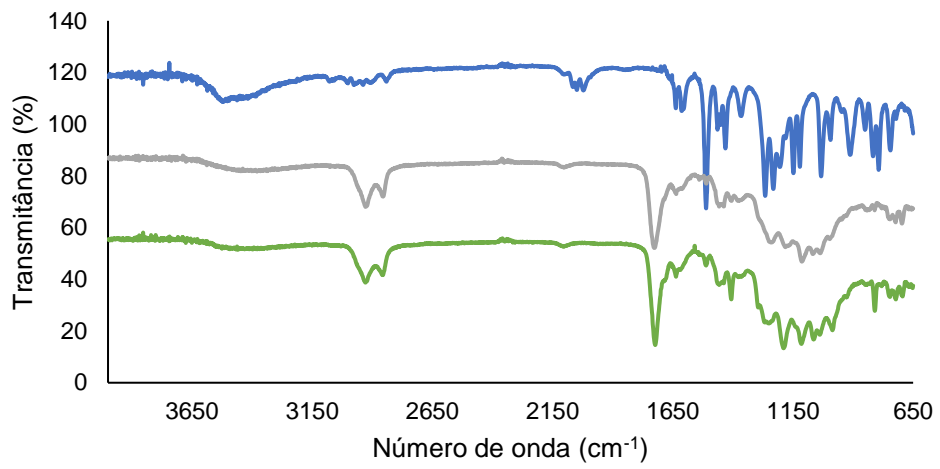
33. doi:10.1088/1361-6501/aac55b
77. Gago JM. Determinação da enformabilidade de tubos à tração [dissertação]. Lisboa: Instituto Superior Técnico. 2018. 95 p.
78. Chaves BJ, Tadi P. Gentamicin [internet]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Sep 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/>
79. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 5). *J Antimicrob Chemother*. 2006 Sep;58(3):511-529. doi:10.1093/jac/dkl277
80. Dashipour A, Razavilar V, Hosseini H, Shojaee-Aliabadi S, German B, Ghanati K, et al. Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil. *Int J Biol Macromol*. 2015 Jan;72:606-613. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.006
81. Vaidya A, Pathak K. Mechanical Stability of Dental Materials. In: Asiri AM, Inamuddin D, Mohammad A, editors. Applications of Nanocomposite Materials in Dentistry. 1st ed. Woodhead Publishing; 2018. p. 285-305.
82. ASTM D 882-02. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International. [WwwAstmOrg](http://www.astm.org). 2002; 1–12.

## Anexos

**Anexo 1.** Espectros de FTIR-ATR das amostras de resina Anycubic® incorporados com EUG, OV e AV.



**Anexo 2.** Espectros de FTIR-ATR das amostras de resina Anycubic® e shellac incorporados com EUG, OV e AV.



**Anexo 3.** Espectros de FTIR-ATR das amostras de resina OSEA incorporados com EUG, OV e AV.

