



Diana Cardoso Luzio

Preparação de sprays poliméricos para o tratamento de lesões tóxicas

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

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Diana Cardoso Luzio

Preparação de sprays poliméricos para o tratamento de lesões tóxicas

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

Supervisores:

Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvinho

Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo

Instituições:

Departamento de Engenharia Química

Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Coimbra
2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas ao longo de todo o meu percurso académico.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Paula Ferreira pelo apoio incondicional, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho, além de palavras de ânimo e incentivo que transmitiu durante a realização do trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Maria Figueiredo, na qualidade de orientadora no presente trabalho.

Agradeço à Doutora Helena Gil pela simpatia e disponibilidade no início do trabalho, fornecendo novas ideias para o desenvolvimento do mesmo. À Doutora Patrícia Alves, pela ajuda incansável na realização dos testes de hemocompatibilidade e na determinação das energias de superfície. Agradeço à Doutora Patrícia Coimbra que me ajudou sempre que foi necessário no laboratório. Quero também agradecer à Engenheira Maria João pelo esforço e paciência na realização das análises de DSC e de reologia. Agradeço ainda à Doutora Ana Clotilde pela disponibilidade para a realização das análises de DMTA.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório, em especial à Rita Samarra, Mariana Santos e Patrícia Santos pela amizade, ajuda durante o trabalho laboratorial, conhecimentos partilhados e companheirismo, fatores muito importantes que permitiram que mantivesse a motivação e ânimo. Aos meus amigos pela paciência e pela partilha dos bons (e menos bons) momentos ao longo do percurso académico, em especial à Mariana Domingues, Susana Bento e Liliana Pedrosa.

Um agradecimento especial ao meu namorado, Ruben Branca, pelo carinho, apoio diário, compreensão pelas minhas ausências, por acreditar sempre em mim e pelas palavras de encorajamento e motivação.

Por último, à minha família, em especial aos meus pais e irmã, por serem modelos de coragem e de força para lutar contra as adversidades da vida, pelo apoio incondicional, pelos diversos sacrifícios suportados, paciência, amor, carinho, incentivo e ajuda para superar todos os obstáculos.

A todos, o meu sincero obrigado,

Diana Cardoso Luzio

Resumo

Atualmente existem no mercado diversos tipos de materiais para o tratamento de feridas, queimaduras e outros tipos de lesões tóxicas. Os curativos mais utilizados são as gazes e as compressas devido à sua capacidade de absorção de fluidos, bem como o facto de serem fáceis de colocar de forma rápidos e quase indolor. Estes materiais são de uso temporário, ou seja, servem para proteger os ferimentos durante um curto período de tempo e não têm a capacidade de auxiliar na cicatrização e regeneração da pele. Por outro lado, estes materiais aderem à superfície das lesões o que pode originar nova hemorragia e danificar os tecidos aquando da sua remoção. São materiais muito utilizados, principalmente em Ambulâncias de Emergência Médica (AEM) até chegar ao Hospital, onde já é possível o tratamento adequado da lesão em causa.

Ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos novos produtos comumente designados por pensos, sendo os mais conhecidos os pensos de hidrogel e de espumas de poliuretano. Ambos são bastante versáteis e podem permanecer no local da lesão durante vários dias.

Não obstante os produtos referidos, existe ainda no mercado uma escassez de produtos para situações de emergência, ou seja, para proteger as lesões de imediato numa situação de acidente. Assim sendo, são necessários produtos que consigam proteger as feridas de forma rápida, evitando a exposição das lesões para utilização em intervenções pré-hospitalares. Neste tipo de situações, em que ocorrerá uma posterior intervenção médica, existe necessidade de recorrer a materiais de utilização temporária, que possam ser removidos com facilidade para tratamento definitivo. Esta remoção não deverá induzir danos adicionais aos tecidos e deverá ser conseguida com o menor desconforto possível.

No presente trabalho procurou-se desenvolver materiais que ofereçam uma nova visão na proteção de lesões respeitando estes requisitos. Desta forma, desenvolveram-se sprays com base em soluções poliméricas a partir de polímeros de base sintética: polietileno glicol (PEG) e polivinil pirrolidona (PVP) e natural: com base na celulose, hidroxipropilcelulose (HPC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Estas soluções poliméricas ao serem pulverizadas à superfície da pele originarão uma membrana de proteção. Adicionalmente foi também incorporado um fármaco nas formulações, tendo sido utilizado como fármaco modelo a dexametasona, um anti-inflamatório.

Para compreender se as formulações detinham as propriedades requeridas foi necessário recorrer a métodos de caracterização avaliando a biocompatibilidade, hemocompatibilidade, solubilidade e adesão aos substratos. A caracterização dos filmes desenvolvidos permitiu aferir que todos apresentavam carácter hidrofílico, solubilizando-se de forma rápida em soluções aquosas. No teste de adesão em tecidos biológicos os materiais apresentaram elevada aderência à superfície dos tecidos biológicos não sendo possível a sua remoção após a formação das membranas. A avaliação do comportamento reológico das soluções poliméricas demonstrou que todos os materiais contêm um comportamento newtoniano. Relativamente às viscosidades das soluções, o HPC-PVP(4:4) apresentou a menor viscosidade, cerca de 0,05 Pa.s enquanto que 0,18 Pa.s foi a viscosidade mais elevada, correspondente à solução HPC-HPMC(4:4). Os valores de energia de superfície de todos os filmes foram inferiores aos apresentados pelo sangue e pele, confirmando a capacidade de adesão dos materiais aos tecidos. Pela técnica de DMTA avaliaram-se as temperaturas de transição vítrea (T_g) de cada filme, tendo todos os filmes apresentado valores distintos. Os materiais HPC-HPMC(3:3) e HPC-HPMC(4:4) exibiram valores entre 108°C e 111°C, enquanto que HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3) apresentaram valores entre 14°C e 32°C, respetivamente. As membranas exibiram carácter não-hemolítico, contudo não foi possível quantificar o índice hemolítico por interferência da turbidez na leitura das densidades óticas. Todos os materiais apresentaram carácter trombogénico auxiliando no estancamento das hemorragias, na ordem dos 70% de formação de trombos. Os materiais revelaram-se biocompatíveis no primeiro dia de ensaio. Após os sete dias de ensaio constatou-se que ocorreu uma diminuição na quantidade de células viáveis. O estudo da atividade antibacteriana revelou que nenhuma das membranas exibiu potencial antibacteriano independentemente da presença da dexametasona.

Os sprays desenvolvidos revelaram algumas propriedades adequadas para a utilização em lesões tópicas demonstrando serem uma estratégia viável para esta aplicação. Estes materiais revelaram ter a capacidade de originar filmes para proteção dos ferimentos, aderir à superfície de tecidos biológicos, solubilização em solução salina e auxílio no processo de coagulação.

Palavras-chave: Lesões tópicas, sprays poliméricos, provisório, proteção, solubilidade.

Abstract

Currently there are a many types of materials for wound treatment, burns and other topical injuries on the market. The most commonly used curative is gauzes and compresses due to their fluid absorption capacity as well as they can be applied on an easy, quickly and almost painless way. However, these materials are for temporary use only, which means that they only serve to protect the wound for a short period of time not being able to assist in the skin healing and regeneration. Moreover, these materials adhere in the surface of the lesions which can lead to further bleeding and tissue damage upon our removal. They're very used materials, especially in Emergency Medical Ambulance (EMA) on the way to an hospital until the appropriate treatment of the wound may be possible.

Over the past decades scientists have developed new products commonly known as pads, being the hydrogel pads and polyurethane foams the best known. Both are very versatile and can remain in the affected location for several days.

Regardless of the above mentioned products, there is still a shortage of products for emergency situations, that are able to protect immediately an injury in an accident situation. Thus, there is a need for a product able to protect quickly a wound, avoiding exposure of lesions for use in pre-hospital interventions. In situations where there is a subsequent medical intervention, there is a need for temporary use of materials that can be easily removed for final treatment. This removal should not lead to additional tissue damage and should be achieved with as little discomfort as possible.

In the present study we sought out to develop materials that provide a new vision in injury protection respecting the above mentioned requirements of safety, easiness and quickness of both applicability and removal. With this in mind, sprays were developed based on polymer solutions from synthetic base polymers: polyethylene glycol (PEG) and polyvinyl pyrrolidone (PVP) and natural: based on cellulose, hydroxypropylcellulose (HPC) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). These polymer solutions to be sprayed to the skin surface result in a protective membrane. Additionally, a drug was also included on the formulations. The anti-inflammatory, dexamethasone, was used as model drug.

To understand if the formulations held the required properties characterization methods were applied to assess biocompatibility, hemocompatibility, solubility and adhesion to substrates.

The characterization of the developed films allowed the assessment that all had hydrophilic character, solubilizing up quickly in aqueous solutions. On the adhesion test to biological tissues the materials showed high adhesion to the surface of biological tissue not being possible to be removed after the formation of the membranes. The rheological behavior of the polymer solutions showed that all materials hold a newtonian behavior. Regarding the viscosities of the solutions, the HPC-PVP(4:4) hold the lowest viscosity with about 0.05 Pa.s while the highest viscosity was of 0.18 Pa.s corresponding to HPC-HPMC(4:4) solution. The surface energy values for all films were lower than those presented by the blood and skin, confirming the adhesiveness of the material to tissue. The glass transition temperature (T_g) of each film was evaluated by DMTA technique having all the films presented different values. The HPC-HPMC(3:3) and HPC-HPMC(4:4) materials showed values between 108°C and 111°C, while HPC-PVP(4:4) and HPC-PVP(5:3) showed values between 14°C and 32°C, respectively. The membranes exhibited non-hemolytic character, but it was not possible to quantify the hemolytic index due to the interference of turbidity on the reading of the optical densities. All materials presented thrombogenic nature assisting on the stagnation of the bleeding in the order of 70% of thrombus formation. The materials showed themselves to be biocompatible in the first day of test. After seven days of test it was found that occurred a decrease in the amount of viable cells. The study of the antibacterial activity revealed that none of the membranes exhibited antimicrobial activity irrespective of the presence of dexamethasone.

The developed sprays revealed some properties suitable for use in topical injuries proving to be a viable strategy for this application. These materials were found to have the ability to give films for protecting wounds, adhere to the surface of biological tissue, solubilization in saline solutions and aid in the clotting process.

Key words: topical wounds, polymeric sprays, temporary, protection, solubility

Índice

Enquadramento e Motivação	1
1. Introdução.....	3
1.1. Tratamento de lesões tópicas	4
1.1.1. Curativos à base de Alginatos	4
1.1.2. Hidrofibras	5
1.1.3. Espumas à base de poliuretanos	5
1.1.4. Filmes à base de poliuretanos	6
1.1.5. Hidrogéis	6
1.1.6. Hidrocolóides	6
1.1.7. Curativos à base de sprays (spray-on).....	7
1.2. Proteção provisória de lesões tópicas.....	8
1.2.1. Seleção dos polímeros e formulações.....	9
1.2.2. Incorporação do fármaco.....	14
2. Materiais e Métodos.....	17
2.1. Materiais.....	17
2.2. Preparação dos materiais poliméricos	18
2.2.1. Avaliação da capacidade de pulverização das soluções poliméricas	20
2.2.2. Incorporação do fármaco.....	20
2.3. Métodos de Caracterização.....	20
2.3.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada.....	20
2.3.2. Propriedades térmicas – Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)	21
2.3.3. Testes de reologia.....	21
2.3.4. Testes de solubilidade em soro fisiológico.....	22
2.3.5. Testes de adesão em tecidos biológicos	23
2.3.6. Determinação das energias de superfície por medição de ângulos de contacto.....	23
2.3.7. Hemocompatibilidade	24
2.3.7.1. Determinação do índice hemolítico.....	24
2.3.7.2. Avaliação da trombogenicidade.....	25
2.3.8. Biocompatibilidade.....	26
2.3.8.1. Estudo da viabilidade celular.....	26
2.3.8.2. Estudo da atividade antibacteriana	27

3. Resultados e Discussão	29
3.1. Preparação dos materiais poliméricos.....	29
3.2. Avaliação da capacidade de pulverização das soluções poliméricas.....	31
3.3. Avaliação das propriedades dos sprays e dos filmes correspondentes	33
3.3.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada	34
3.3.2. Propriedades térmicas - Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)	35
3.3.3. Testes de reologia.....	38
3.3.4. Testes de solubilidade em soro fisiológico.....	40
3.3.5. Testes de adesão em tecidos biológicos	42
3.3.6. Determinação das energias de superfície por medição de ângulos de contacto.....	43
3.3.7. Hemocompatibilidade	45
3.3.7.1. Determinação do índice hemolítico.....	45
3.3.7.2. Avaliação da trombogenicidade.....	46
3.3.8. Biocompatibilidade.....	48
3.3.8.1. Estudo da viabilidade celular.....	48
3.3.8.2. Estudo da atividade antibacteriana	50
3.4. Resumo das propriedades dos sprays.....	52
4. Conclusão	53
5. Perspetivas Futuras	57
6. Referências Bibliográficas	59
Anexos	65
Anexo A. Curativos Tradicionais	65
Anexo B. Curativos à base de materiais artificiais para o tratamento de ferimentos e queimaduras.....	66
Anexo C. Propriedade dos reagentes utilizados	67
Anexo D. Avaliação qualitativa das formulações desenvolvidas.....	68
Anexo E. Regiões de absorção da radiação de infravermelhos em polímeros	71

Índice de Tabelas

Tabela 1. Formulações de PVB, PVP, HPC, HPMC para a produção de filmes poliméricos.	19
Tabela 2. Características obtidas das membranas poliméricas à base de PVB, PVP, HPC e HPMC. Muito pouco/a (--); Pouco/a (-); Bem (+); Muito bem (++)	30
Tabela 3. Avaliação da capacidade de pulverização das soluções selecionadas. Muito pouco/a (-); Pouco/a (-); Bem (+); Muito bem (++)	31
Tabela 4. Características obtidas para cada solução polimérica em estudo.	32
Tabela 5. Características obtidas para cada membrana polimérica desenvolvida. Bem (+); Muito bem (++); Excelente (+++)	33
Tabela 6. Valores das viscosidades para cada solução polimérica desenvolvida.	40
Tabela 7. Tempos de solubilização para cada filme desenvolvido.	42
Tabela 8. Valores de energia de superfície e correspondentes componentes dispersivas e polares para os filmes poliméricos desenvolvidos, pele e sangue.	44
Tabela 9. Resumo das propriedades avaliadas no presente trabalho.	52

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura representativa do polivinil butiral (PVB).	10
Figura 2. Estrutura representativa do polivinil pirrolidona (PVP).	11
Figura 3. Estrutura representativa do polietileno glicol (PEG).	12
Figura 4. Estrutura representativa do hidroxipropilcelulose (HPC).	13
Figura 5. Estrutura representativa de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).	14
Figura 6. Estrutura representativa da dexametasona.	15
Figura 7. Fotografias dos filmes desenvolvidos: a) HPC-HPMC(3:3); b) HPC-HPMC(4:4); c) HPC-PVP(4:4);	33
Figura 8. Espectros ATR-FTIR de HPC-HPMC(3:3), HPC-HPMC(4:4), HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3).	34
Figura 9. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-HPMC(3:3).	36
Figura 10. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-HPMC(4:4).	36
Figura 11. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-PVP(4:4).	37
Figura 12. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-PVP(5:3).	37
Figura 13. Perfis da tensão de corte de acordo com a variação da taxa de deformação para o HPC-HPMC(3:3) (—); para o HPC-HPMC(4:4) (·····); para o HPC-PVP(4:4) (-----) e para o HPC-PVP(5:3) (·····).	39
Figura 14. Perfis da viscosidade de acordo com a variação da taxa de deformação para o HPC-HPMC(3:3) (—); para o HPC-HPMC(4:4) (·····); para o HPC-PVP(4:4) (-----) e para o HPC-PVP(5:3) (·····).	39
Figura 15. Processo de solubilização das amostras em soro fisiológico, cerca de 2 em 2 min.	41
Figura 16. Fotografias dos filmes desenvolvidos: i) após a sua pulverização; ii) após a sua secagem: a) HPC-HPMC(3:3); b) HPC-HPMC(4:4); c) HPC-PVP(4:4) e d) HPC-PVP(5:3)	43
Figura 17. Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície das membranas, após 45 min de contato do sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras; K+, controlo positivo.	47
Figura 18. Avaliação da atividade celular durante sete dias de contacto com os filmes. K-, controlo negativo; K+, controlo positivo.	49
Figura 19. Avaliação da atividade bacteriana durante 48 horas de contacto com os filmes. K-, controlo negativo; K+, controlo positivo.	51

Lista de Símbolos e abreviaturas

A	Área (m ²)
DO_{teste}	Densidade ótica obtida nos testes
DO_{cp}	Densidade ótica do controlo positivo
DO_{cn}	Densidade ótica do controlo negativo
E'	Módulo de armazenamento (Pa)
E''	Módulo de dissipação (Pa)
η	Viscosidade (Pa.s)
F	Força aplicada (N)
m_{cg}	Massa média de coágulo formado em cada amostra (g)
m_{cn}	Massa média de coágulo formado no controlo negativo (branco) (g)
m_{cp}	Massa média de coágulo formado no controlo positivo (g)
θ	Angulo de contacto (°)
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação (s ⁻¹)
γ	Energias de superfície (mN/m)
γ_s^d	Componente dissipativa da energia de superfície (mN/m)
γ_s^p	Componente polar da energia de superfície (mN/m)
τ	Tensão de corte (Pa)
T_g	Temperatura de transição vítrea (°C)
AEM	Ambulância de Emergência Médica
ASTM	<i>American society for testing and materials</i>
ATR-FTIR	Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada por transformada de Fourier
CFU	<i>Colony forming unit</i>
DEX	Dexametasona
DMEM-F12	Meio eagle modificado por <i>dulbecco</i>
DMTA	Análise térmica dinâmico-mecânica
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EVITA	Epidemiologia e vigilância dos traumatismos e acidentes
FBS	Soro fetal de bovino
FDA	<i>Food and drug administration</i>
Hb	Hemoglobina
HPC	Hidroxipropilcelulose
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ISO	<i>International organization for standardization</i>
IV	Radiação infravermelha
MTS	<i>3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
NHDF	Células criopreservadas de fibroblastos humanos
PBS	Solução de tampão fosfato
PEG	Polietileno glicol
PVB	Polivinil butiral
PVP	Polivinil pirrolidona
PVP-I	Povidona-iodo

SNS	Serviço nacional de saúde
TMTD	Dissulfeto de tetrametiltiram
UBI	Universidade da Beira Interior
UV	Radiação ultravioleta

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Enquadramento e Motivação

Nos últimos anos, o desenvolvimento de produtos para o tratamento de lesões tópicas permitiu um enorme progresso na área da Medicina. No dia-a-dia, ocorrem diversos tipos de acidentes que necessitam de tratamento imediato no local. Deste modo, existe uma vasta gama de produtos que possibilitam proteger e proporcionar as condições necessárias para a cicatrização e regeneração da pele.

Nos casos de emergência, os produtos devem ser eficientes, rápidos de aplicar, práticos e confortáveis. Todavia, esses produtos quando em contacto com a ferida, não devem originar reações adversas (imunológicas e inflamatórias), devem ser permeáveis ao oxigénio, devem conseguir estancar a hemorragia, se existir, e a sua remoção deve ser fácil.

No mercado, existem diversos curativos com características e funcionalidades muito diferentes no qual os mais conhecidos são os hidrogéis e as espumas à base de poliuretano devido às suas capacidades de absorver elevadas quantidades de fluidos e por promoverem um microambiente favorável à cicatrização da pele.

Um dos produtos menos investigados até então, são os sprays de solução polimérica. Estes funcionam de uma forma rápida e eficaz, pulverizando-se uma mistura polimérica que leva à formação de uma membrana na superfície da pele que tem a capacidade de proteger.

Assim, este trabalho pretende investigar novas formulações poliméricas com o sistema em aplicação em spray. O projeto foca-se no estudo da preparação e desenvolvimento das formulações das soluções poliméricas à base da combinação de polímeros e por fim, a caracterização das soluções e dos filmes formados para aplicações em situações de emergência.

O trabalho encontra-se dividido e organizado em cinco capítulos principais. No **Capítulo 1, Introdução**, é feito um enquadramento geral dos produtos presentes no mercado para a proteção e tratamento de lesões tópicas. Apresentam-se as características principais de alguns dos produtos bem como as suas vantagens e desvantagens de utilização. Por outro lado, apresenta-se destaque nos curativos à base de spray de solução polimérica.

No **Capítulo 2, Materiais e Métodos**, é feita uma listagem de todos os materiais utilizados na síntese e nos testes de caracterização. De seguida, explica-se detalhadamente o processo de síntese dos filmes poliméricos com diferentes concentrações e formulações. Por último, apresentam-se todas as técnicas recorridas para caracterização dos materiais poliméricos tais como caracterização por ATR-FTIR, caracterização térmica (DMTA), teste de solubilização em soro fisiológico, teste de adesão a tecidos biológicos, testes de viscosidade de soluções, determinação das energias de superfície por medição de ângulos de contacto, testes de hemocompatibilidade (índice hemolítico e trombogenicidade) e testes de biocompatibilidade (viabilidade celular e atividade antibacteriana). No **Capítulo 3, Resultados e Discussão**, apresentam-se todos os resultados obtidos e conclusões para cada teste de caracterização.

No **Capítulo 4, Conclusões**, são descritas as conclusões gerais ao longo do trabalho realizado e por fim, no **Capítulo 5, Perspetivas Futuras**, apresentam-se novas ideias do trabalho a desenvolver e o conjunto de linhas de investigação para o futuro.

1. Introdução

Os acidentes não intencionais resultantes em lesões tópicas de variados graus de gravidade ocorrem em muitas situações no dia-a-dia, sendo necessário um tratamento rápido e eficaz. Dependendo do tipo de lesão, o seu tratamento pode ser realizado em casa ou então recorrer-se a assistência médica.

No período de 2010 a 2014, foi realizado um estudo pelo sistema de Epidemiologia e vigilância dos traumatismos e acidentes (EVITA), que comprovou terem sido registados nas urgências do serviço nacional de saúde (SNS) cerca de 24 752 acidentes definidos como acidentes domésticos e de lazer. Neste estudo também foi possível verificar que a segunda principal causa de assistência médica (12,8%) são as lesões abertas da pele. Este estudo não inclui acidentes como acidentes de viação, de trabalho ou casos de violência (Neto & Rodrigues, 2015).

Este mesmo estudo indica que as faixas etárias com maior tendência à ocorrência de acidentes são as crianças mas também os idosos com mais de 65 anos (Neto & Rodrigues, 2015). No dia-a-dia, as lesões tópicas podem ser originadas por abrasões, lacerações, cortes, mordidas, queimaduras, entre outros. Posto isto, em casos de emergência recorre-se aos produtos que proporcionam proteção dos ferimentos de forma eficiente e que sejam de fácil aplicação.

A investigação de novos materiais para o tratamento de lesões tópicas tem permitido a evolução e a criação de uma vasta gama de produtos com características e funcionalidades diferentes. Os produtos presentes no mercado para o tratamento de feridas têm como principal função a proteção das lesões à superfície da pele bem como a capacidade de estancar e absorver uma possível hemorragia.

Atualmente, em acidentes domésticos de pequena gravidade é comum utilizarem-se pensos, sendo que existem vários tipos. Por outro lado, quando ocorrem acidentes de elevada gravidade é necessário auxílio de assistência médica por parte de profissionais qualificados. Nestes casos, os auxiliares médicos recorrem geralmente a soro fisiológico para lavagem do ferimento e a compressas para limpeza e absorção dos fluidos fisiológicos. Estes materiais são utilizados como 1ª linha de socorro apenas até ser possível o tratamento adequado já no hospital.

1.1. Tratamento de lesões tópicas

Ao longo dos anos, com a investigação e desenvolvimento dos materiais foi possível criar novos produtos com melhores propriedades e com maior abrangência no que respeita ao tratamento de lesões da pele.

Os curativos podem ser classificados em curativos passivos ou interativos. Curativos passivos são produtos simples sem efeito direto sob o ferimento, tendo apenas como função a proteção da área afetada (e.g. gazes). Atualmente, os curativos desenvolvidos classificam-se como interativos pela sua capacidade de interagir com a superfície da ferida para fornecer um microambiente favorável à cicatrização da pele (Sarabahi, 2012).

Os materiais para o tratamento de lesões tópicas devem conter alguns requisitos importantes para garantir a proteção dos ferimentos, facilitando também os processos de cicatrização e regeneração da pele. Scales, em 1956, destacou uma série de requisitos que considerou como sendo essenciais para um curativo eficaz (Sarabahi, 2012).

- × Manter um microambiente húmido;
- × Capacidade de estancar a hemorragia;
- × Permitir isolamento térmico;
- × Permitir trocas de gases (permeabilidade ao oxigénio);
- × Proteção a microorganismos externos;
- × Biocompatível;
- × Não originar reações adversas (inflamatórias e imunológicas)
- × Não aderente e de fácil remoção;

De seguida, descrevem-se alguns dos tipos de produtos mais utilizados no mercado, as suas características bem como as suas vantagens e desvantagens. Estes produtos são muitas vezes utilizados por si só ou em combinação.

1.1.1. Curativos à base de Alginatos

Os pensos de alginato são produzidos a partir de produtos derivados de algas marinhas e apresentam como principais características a sua elevada capacidade de absorção, maleabilidade, biodegradabilidade e não-aderência. Estes materiais são mais apropriados em

ferimentos com elevada hemorragia pois em contacto com os fluidos fisiológicos formam um gel hidrofílico, protegendo a área afetada. Estes pensos têm a capacidade de absorver até 20 vezes o seu peso líquido e conseguem manter um microambiente fisiologicamente húmido promovendo a cicatrização e a regeneração da pele (Snyder, 2008). Estes materiais biodegradáveis, em contacto com a ferida vão, como o próprio nome indica, sofrendo degradação ao longo do tempo sendo também possível removê-los utilizando soluções aquosas salinas (soro fisiológico). Estes processos permitem assim a remoção de forma indolor não interferindo com a cicatrização da área afetada. (Tissue, 2015). Por outro lado, existem alguns pensos de alginato com prata na sua composição para melhorar a sua atividade antimicrobiana e proteger a ferida da colonização por bactérias (Heenan, 1998).

1.1.2. Hidrofibras

Os pensos de hidrofibras apresentam propriedades semelhantes aos de alginato no que respeita à sua capacidade de absorção sendo capazes de absorver cerca de 5 vezes o seu próprio peso antes de perder a integridade. Estes pensos são geralmente constituídos por carboximetilcelulose que, em contacto com a hemorragia, forma um gel na superfície da área afetada. Ocasionalmente, é colocado um penso secundário sobre este penso, por exemplo um hidrocolóide com o objetivo de proteger melhor os ferimentos (ati. Nursing Education, 2008).

1.1.3. Espumas à base de poliuretanos

As espumas são geralmente formadas por poliuretano semipermeável, não-aderente em que são hidrofílicas. Estes materiais permitem a passagem de vapor de água mas também conseguem fornecer isolamento térmico na área afetada (Tissue, 2014b).

Estes pensos são recomendados em feridas com hemorragia moderada e estes produtos podem ser utilizados em tratamento primário (contacto direto com a ferida) ou então secundário (utilizados para cobrir um material primário para fins de proteção), revestindo por exemplo pensos à base de alginatos (Tissue, 2014b).

Este produto comporta-se como uma camada suave que protege a área afetada proporcionando um ambiente propício para a regeneração da pele. Outras vantagens incluem o fato de não aderir à ferida, de fornecer uma barreira contra os contaminantes e serem fáceis de aplicar e remover.

1.1.4. Filmes à base de poliuretanos

Recentemente, alguns curativos à base de filmes semipermeáveis têm sido fabricados a partir de poliuretano sendo conhecidos por filmes de plástico. Este tipo de penso não tem qualquer capacidade de absorção de fluidos sendo apenas utilizados em feridas secas ou com pouca hemorragia. Por outro lado, este tipo de material é permeável ao oxigénio, não permitindo a formação de um ambiente anaeróbio, inibindo assim o crescimento de bactérias anaeróbias sobre a ferida.

A principal desvantagem destes filmes diz respeito à dificuldade na sua remoção. Devido à sua elevada aderência à pele, a sua remoção resulta comumente em danos na área afetada pela lesão (ati. Nursing Education, 2008).

1.1.5. Hidrogéis

Os hidrogéis são constituídos por polímeros hidrofílicos com elevada capacidade de absorção permitindo a interação e troca de fluidos entre o material e a superfície da ferida. Assim, este material permite manter um ambiente adequado para a cicatrização e auxilia na proteção da ferida, promovendo uma regeneração eficiente (Tissue, 2014a).

Este tipo de pensos apresenta algumas lacunas, incluindo a impossibilidade de se utilizarem em ferimentos com elevado grau de hemorragia e a necessidade de utilizar curativos secundários por poderem desidratar facilmente. Em contrapartida, os hidrogéis não aderem à superfície da ferida e devido ao alto teor de água dos hidrogéis é possível arrefecer a ferida aliviando a dor e o desconforto do paciente (Morgan, 2014).

1.1.6. Hidrocolóides

Os hidrocolóides são um tipo de penso conhecido por conter agentes de formação de gel (partículas coloidais hidrofílicas), geralmente de gelatina ou carboximetilcelulose de sódio, combinado com uma espuma ou um filme, geralmente de poliuretano. Este produto é assim composto por duas camadas: uma camada superior suave (protegendo os ferimentos das agressões do meio ambiente) e uma camada inferior absorvente e adesiva (em contacto direto com as lesões).

A camada adesiva interage com o sangue, formando um gel suave. Após a sua remoção, não permanecem resíduos de gel proporcionando uma remoção fácil e sem danificar os tecidos. Estes pensos podem ser utilizados em muitos tipos diferentes de feridas mas especialmente

nos ferimentos com hemorragia difusa pois não têm uma capacidade de absorção tão elevada como os pensos de alginato (Tissue, 2013).

As grandes vantagens deste tipo de material são a facilidade de aplicação, a proteção a microorganismos externos (bactérias, entre outros..) e a não aderência à ferida mas sim à pele circundante, sendo que desta forma não danificam a área afetada. Apresenta como limitação a impossibilidade da sua utilização em ferimentos com hemorragia significativa (EuroMed, 2014).

1.1.7. Curativos à base de sprays (spray-on)

Com o desenvolvimento dos processos de engenharia e tecnologia surge a possibilidade de criar materiais mais complexos para corresponder aos critérios e necessidades no tratamento de ferimentos.

No mercado existem já alguns sprays que têm como objetivo limpar e desinfetar as feridas antes do tratamento final. Os sprays desinfetantes são constituídos essencialmente por agentes antissépticos que eliminam os microorganismos presentes à superfície da pele. Um dos sprays mais conhecidos é o spray Betadine®. A formulação deste é constituída por Povidona-iodo (PVP-I) também conhecido por ser um complexo solúvel em água de iodo e polivinil pirrolidona (PVP). No entanto, este tipo de sprays não têm a capacidade de estancar a hemorragia nem de proteger as lesões contra agressões externas (Betadine®, 2014).

Atualmente, têm vindo a ser desenvolvidos sprays de solução polimérica cujo objetivo é estancar a hemorragia tópica a partir da pulverização da mistura polimérica e que em poucos segundos, criam uma barreira (filme) na superfície da pele, o que permite a desinfeção da ferida e a sua proteção, simultaneamente.

No mercado existem já alguns sprays à base de soluções poliméricas que fornecem ação imediata contra microrganismos externos. Um dos sprays mais conhecidos designa-se comercialmente por Elastoplast® que contém na sua composição etanol, água, éter dimetílico, poliuretano e um copolímero acrílico. Uma vez depositada a solução polimérica na superfície, ocorre a formação de um filme flexível e resistente à água. Este filme tem como objetivo promover a proteção da ferida contra as condições externas durante alguns dias, tempo este essencial ao início do processo de regeneração da pele (Elastoplast®, 2009; Daunton, Kothari, Smith, & Steele, 2012).

Contudo, este produto apresenta algumas desvantagens tais como a dificuldade de remover o filme formado à superfície da ferida, danificando-a e promovendo uma nova hemorragia, assim como a sua incapacidade em absorver grandes quantidades de fluidos.

Outro produto existente no mercado, comercialmente conhecido por Nobecutane[®], permite um tratamento simples e económico. Este spray possui na sua composição resina acrílica e dissulfeto de tetrametilam (TMTD) (fortemente bactericida e fungicida) dissolvido em acetato de etilo (Brodovsky, Dagan, & Ben-Bassatt, 1986). O Nobecutane[®] funciona da mesma forma que o spray apresentado anteriormente, produzindo filmes transparentes com a capacidade de proteger as áreas afetadas ao longo de vários dias. Após a cicatrização e regeneração das lesões, as membranas destacam-se espontaneamente, sem originar novos danos na pele (Eller, 1955).

1.2. Proteção provisória de lesões tóxicas

Os materiais descritos anteriormente têm características que permitem a proteção da ferida, assim como a capacidade de acelerar a cicatrização da pele e são utilizados para permanecerem no local da lesão ao longo de alguns dias.

Contudo, existem situações onde se pretende apenas um tratamento da lesão no imediato. Numa situação de tratamento de pré-urgência, seja vantajoso a utilização de um material que proteja e desinfete as lesões, induza coagulação mas que seja facilmente removido por lavagem uma vez chegada a vítima à presença de pessoal médico especializado.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um produto para aplicação provisória, retirando-se posteriormente o produto de forma a efetuar o tratamento adequado para o ferimento quando em ambiente hospitalar. Considerando que os grupos de população onde ocorre maior incidência de acidentes são as crianças, os idosos e os desportistas, definiu-se que a formulação mais vantajosa seria o spray com base em soluções poliméricas, uma vez que é um produto fácil de aplicar, não necessitando de competências técnicas específicas para a sua utilização, sendo também fácil de transportar.

Assim, e de forma resumida, este trabalho teve como intuito desenvolver um produto inovador com os seguintes requisitos:

- Fácil aplicação à superfície da pele sob a forma de spray;
- Capacidade de formação de filme de forma rápida;
- Não originar respostas adversas no organismo;
- Capacidade de estancar hemorragias ainda que apenas difusas;
- Facilidade na remoção do filme com o auxílio de solução aquosas (soro fisiológico ou água);

Seguidamente, descreve-se a seleção dos polímeros e solventes para a produção das soluções poliméricas, tendo em conta os requisitos apresentados anteriormente.

1.2.1. Seleção dos polímeros e formulações

Para a seleção de todos os materiais necessários na formulação das soluções poliméricas foi essencial ter em conta algumas características principais para este produto. Uma das características fundamentais nos filmes poliméricos formados pela pulverização da mistura é a sua solubilização em soluções aquosas como a água ou soro fisiológico. Assim, torna-se possível remover os filmes sem danificar os tecidos nem originar uma nova hemorragia. Por outro lado, os polímeros devem ser solúveis num solvente adequado à produção dos sprays.

O primeiro passo foi a seleção do solvente para a formulação base do spray o qual será um agente antisséptico auxiliando a desinfeção da ferida. O solvente deve possuir ponto de ebulição baixo para que ocorra a formação do filme com base no método de evaporação de solvente uma vez colocado em contacto com a superfície da pele. Desta forma, foi possível selecionar dois solventes de base álcool para esta aplicação, o etanol e o isopropanol. Comparando as propriedades dos dois solventes selecionou-se o etanol pois possui um ponto de ebulição inferior ao do isopropanol, sendo mais volátil e facilitando a formação da membrana à superfície da pele.

Paralelamente, foi feita a seleção dos polímeros com as propriedades necessárias tais como a solubilidade no solvente selecionado, a capacidade de formar filmes poliméricos pelo método de evaporação de solvente à superfície da pele, bem como desses mesmos filmes serem solúveis em soluções aquosas.

Pela análise da literatura foi possível selecionar alguns polímeros que possuem algumas das características pretendidas. Os materiais selecionados são seguidamente apresentados, sendo também descritas algumas das suas principais propriedades.

➤ **Polivinil butiral (PVB)**

O polivinil butiral (PVB) é uma resina termoplástica com características muito interessantes. Este polímero apresenta uma estrutura química composta por grupos butiral, acetilo e hidroxílicos (Figura 1).

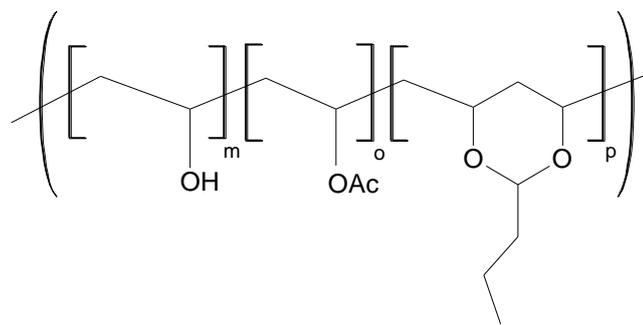


Figura 1. Estrutura representativa do polivinil butiral (PVB).

O processo de produção deste polímero foi desenvolvido em 1939, tendo vindo a ser constantemente otimizado para aplicações inovadoras. A produção do polivinil butiral consiste na reação de acetilação do polivinil álcool em solução aquosa com butiraldeído e com o auxílio de pequenas quantidades de ácido mineral (Kuraray Group, 2014).

O polímero PVB exibe combinações de propriedades notáveis como elevada resistência mecânica, solubilidade em solventes orgânicos (álcool, éster, entre outros) sendo no entanto, insolúvel em soluções aquosas. Por outro lado, apresenta a capacidade de formação de filmes transparentes e de adesão em diversos tipos de superfícies (Eastman Chemical Company, 2013).

Atualmente, a principal área de aplicação deste material é na produção de vidro laminado para a indústria automóvel bem como para a indústria de construção civil. No entanto, é ainda muito solicitado na produção de tintas, lacas e vernizes (por exemplo primários e de anti corrosão no revestimento de superfícies metálicas), tintas de impressão e adesivos (Kuraray Group, 2014).

Nos últimos anos este polímero tem vindo a ser cada vez mais utilizado na produção de partículas para potenciais aplicações biomédicas como imagiologia ótica e sistemas de libertação controlada de fármacos (Posavec, Dorsch, Bogner, Bernhardt, & Nagl, 2011).

➤ **Polivinil pirrolidona (PVP)**

O polivinil pirrolidona (PVP), também conhecido por povidona, é constituído por unidades de repetição do monómero vinilpirrolidona, sendo produzido a partir da sua polimerização radicalar em solução, com o auxílio de um iniciador. A sua estrutura encontra-se representada na Figura 2.

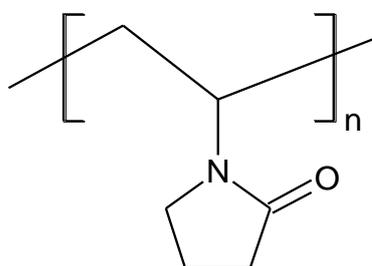


Figura 2. Estrutura representativa do polivinil pirrolidona (PVP).

O PVP possui diversas propriedades importantes que permitem a sua utilização em diversas áreas de aplicação. Uma dessas propriedades é a sua solubilidade em água bem como em outros solventes orgânicos polares (álcoois, clorofórmio, ácido fórmico e ácido acético). Esta característica deve-se ao facto de possuir na sua constituição grupos hidrofílicos mas também hidrofóbicos, permitindo interações com vários tipos de solventes (Koczur, Mourdikoudis, Polavarapu, & Skrabalak, 2015).

Este polímero também é conhecido pela sua capacidade de adesão em diversos tipos de superfícies, pela facilidade de produzir filmes com elevada elasticidade e além disso, pela possibilidade de formação de complexos com outros compostos, como fármacos (Yeh, et al., 2006).

Este polímero principalmente utilizado na indústria farmacêutica (como excipiente nas formulações), na cosmética (preparações de fixação do cabelo (laca)) e na indústria alimentar. Além disto, também pode ser utilizado noutras aplicações como adesivos, revestimento para papéis, tintas para impressoras (inkjet), têxteis, entre outras (NIPPON SHOKUBAI, 2001).

➤ **Polietileno glicol (PEG)**

O polietileno glicol é um poliéster sintético utilizado globalmente em diversas áreas. Este polímero apresenta propriedades que permitem a sua utilização em sistemas biológicos tais como não toxicidade, não imunogenicidade e elevada flexibilidade. O PEG também possui propriedades anfotéricas, ou seja, tem carácter hidrofóbico mas também hidrofílico devido à presença de carbonos alifáticos e de grupos hidroxílicos na sua constituição, respetivamente (Figura 3). Assim, este polímero tem elevada solubilidade em soluções aquosas bem como em solventes orgânicos. Outra característica importante do PEG é a higroscopicidade, ou seja, a capacidade de absorver e reter humidade, devido à presença dos grupos hidroxílicos (DOW®, 2011).

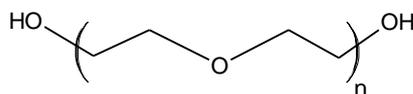


Figura 3. Estrutura representativa do polietileno glicol (PEG).

O conjunto das propriedades apresentadas anteriormente permitiu que o PEG fosse aprovado pela FDA para a utilização em variadas áreas mas principalmente, aplicações biomédicas como na cicatrização e regeneração de tecidos biológicos ou em sistemas de libertação controlada de fármaco (D'Souza & Shegokar, 2016).

Este polímero tem permitido a preparação de materiais com variadas propriedades na indústria farmacêutica, exercendo funções de lubrificante (pasta de dentes), agente dispersante, excipiente (comprimidos e cremes) ou mesmo laxante (DOW®, 2011; Kadajji & Betageri, 2011).

➤ **Derivados de Celulose**

Os derivados de celulose são comumente utilizados em diversas indústrias incluindo a construção, alimentar, cosmética e farmacêutica. No decorrer deste presente trabalho recorreu-se a dois tipos de derivados: hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose que serão seguidamente descritos.

Hidroxiopropilcelulose (HPC)

A hidroxiopropilcelulose (HPC) é um polímero derivado da celulose (Figura 4) cuja produção resulta da reação entre a celulose alcalina com óxido de propileno, a temperatura e pressões elevadas.

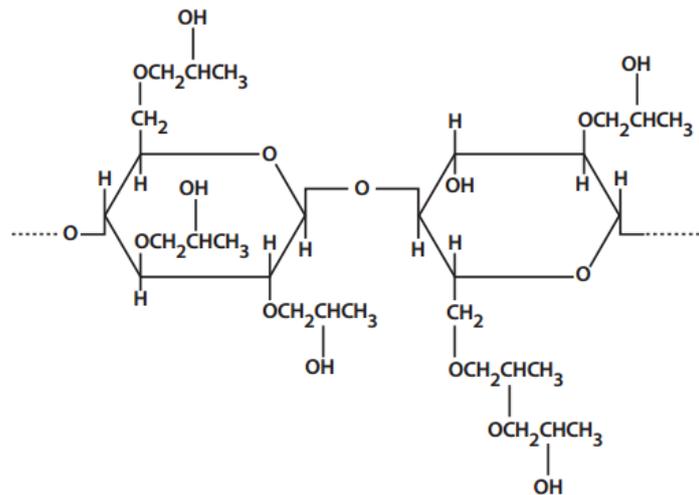


Figura 4. Estrutura representativa do hidroxiopropilcelulose (HPC).

A hidroxiopropilcelulose possui propriedades anfotéricas por apresentar na sua composição química grupos de carácter hidrofílico como os grupos hidroxílicos, permitindo a interação com as moléculas da água. Assim sendo, este polímero exibe solubilidade em soluções aquosas. Relativamente ao seu carácter hidrofóbico, é devido à presença de carbonos alifáticos permitindo a sua solubilização em solventes orgânicos polares (álcoois, propileno glicol, entre outros) (Ashland Specialty Ingredients, 2014). Contudo, este polímero exibe outras características bastante atrativas para diversas aplicações. Combina elevada flexibilidade mesmo sem adição de plastificantes e termoplasticidade.

As áreas de aplicação mais usuais para a utilização de HPC são a cosmética, a alimentar, a farmacêutica e a papelreira, exercendo funções de agente espessante, estabilizador e de suspensão. O polímero HPC é utilizado essencialmente em aerossóis como laca para cabelo, bem como revestimento e encapsulamento de comprimidos e cápsulas (Ashland Specialty Ingredients, 2014).

Hidroxiopropilmetilcelulose (HPMC)

A hidroxiopropilmetilcelulose, também conhecido por hipromelose, é produzida através da reação de fibras de celulose com óxido de propileno e metilcloreto, em meio alcalino. Nos últimos anos, tem sido largamente utilizado como uma alternativa à gelatina e ao glúten em alimentos, direcionado a regimes de alimentação vegetariana (Thanedar, 2014).

Tal como o polímero apresentado anteriormente, a HPMC apresenta grupos de carácter hidrofílico bem como hidrofóbico sendo como tal solúvel tanto em soluções aquosas como em solventes orgânicos polares (SIGMA-ALDRICH, 2002). A sua estrutura encontra-se na Figura 5.

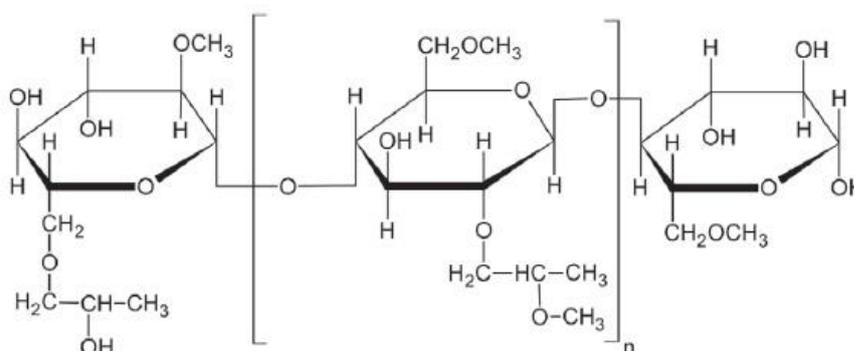


Figura 5. Estrutura representativa de hidroxiopropilmetilcelulose (HPMC).

A HPMC apresenta propriedades aliciantes para diversas aplicações como a sua capacidade de formação de filmes aplicados muitas vezes em revestimento de diferentes superfícies. Por outro lado, este polímero é utilizado também como agente espessante, lubrificante e emulsionante. As características e propriedades deste polímero permitem a sua utilização em diversas aplicações na área farmacêutica como em revestimento de comprimidos, de forma a ocultar o sabor ou a aparência. Por outro lado, este polímero é largamente utilizado em sistemas de libertação controlada de fármacos, nomeadamente na formação de géis tópicos, pois o HPMC apresenta capacidade de ligação com os fármacos, o que permite uma libertação lenta e eficaz (Huichao, Shouying, Yang, Ying, & Di, 2014).

1.2.2. Incorporação do fármaco

A formação dos filmes poliméricos sobre os ferimentos, pode induzir respostas adversas no organismo, ativando sistemas de defesa contra corpos estranhos, designados por respostas

inflamatórias. É possível prevenir este fenómeno através da administração de fármacos que podem ser incorporados imediatamente na solução polimérica do spray. Assim sendo, após a formação da membrana sobre a lesão, esta permite a libertação do fármaco, que é absorvido *in situ*, exercendo a sua atividade localmente.

Um dos fármacos que é mais utilizado em aplicações tópicas é a dexametasona (Figura 6). Este fármaco pertence à classe dos corticosteroides e é utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes. A dexametasona apresenta um peso molecular de 392,46 g/mol e um ponto de ebulição e de fusão na ordem de 568,2°C e 260-264°C, respetivamente. Outra propriedade importante para a incorporação do fármaco nas formulações dos sprays é a sua solubilidade em etanol (6 mg/mL) bem como em água (1 mg/mL) (Royal Society of Chemistry, 2015).

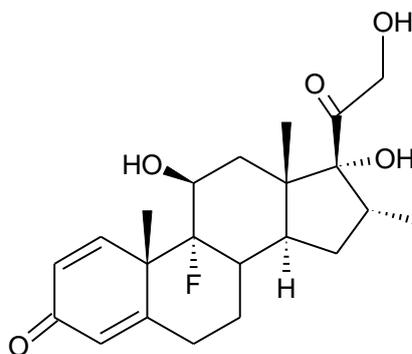


Figura 6. Estrutura representativa da dexametasona.

Ao longo dos últimos anos, a dexametasona tem sido investigada para diversas aplicações biomédicas no tratamento de doenças inflamatórias, para promover a diferenciação celular, no tratamento de doenças oftálmicas bem como em cremes e loções tópicas para inibir as reações alérgicas (Coltro, 2014).

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Para a realização da síntese dos materiais poliméricos recorreu-se ao uso de diversos polímeros como polivinil butiral (PVB, Mowital B60H) e o polivini pirrolidona (PVP, Mw \approx 10,000) fornecidos pela *Sigma-Aldrich*, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC, Mw \approx 10,000) e o hidroxipropilcelulose (HPC, Mw \approx 100,000) fornecidos pela *Alfa Aesar* (Alemanha). Relativamente à solução base utilizada na preparação dos filmes poliméricos recorreu-se ao uso de etanol (96%) fornecido pelo JMGS (Portugal) e como plastificante utilizou-se o polietileno glicol (PEG, Mw \approx 400) fornecido pela *Sigma-Aldrich*.

Na incorporação do fármaco nas soluções poliméricas utilizou-se a dexametasona fornecido pela *Cayman Chemical Company* e para preparação de soro fisiológico recorreu-se ao cloreto de sódio (99,5%) adquirido pela *PanReac AppliChem*.

Para executar os diversos testes de caracterização recorreu-se a diversos solventes como a formamida (99%) e o etilenoglicol (99,8%) fornecida pela *Sigma-Aldrich* para a determinação das energias de superfície e o formaldeído (99%) fornecido pela *Sigma-Aldrich* para realização do teste de hemocompatibilidade. Também para a realização deste teste utilizou-se o sangue venoso anticoagulado de coelho adquirido pela PROBIOLÓGICA (Empresa de Produtos Biológicos, Lda.).

Para realizar os testes de biocompatibilidade desenvolvidos na Universidade da beira Interior (UBI, Covilhã) foi utilizado soro fetal bovino (*Foetal bovine serum*, FBS) adquirido a partir da *Biochrom AG* (Berlim, Alemanha), fibroblastos normais dermais humanos (*Normal Human Dermal Fibroblasts adults*, NHDF) foram fornecidos pela *PromoCell (Labclinics, S.A., Barcelona, Espanha)*. Relativamente ao meio Eagle modificado por *Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM-F12), ácido etilenodiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), gentamicina, tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), rezasurina (*7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide*) e tripsina foram obtidos da *Sigma Aldrich* (Sintra, Portugal). Por fim, o 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) foi adquirido pela *Promega* (Canadá, Estados Unidos da América).

2.2. Preparação dos materiais poliméricos

A estratégia adotada para a preparação das soluções poliméricas consistiu na seleção das formulações mais indicadas para aplicação em estudo. Deste modo, preparou-se um conjunto de formulações iniciais, no qual se combinaram diversos polímeros em diferentes concentrações para averiguar as suas propriedades singulares. As formulações dividiram-se em quatro grupos sendo cada grupo composto por um polímero base diferente: PVB, PVP, HPC e HPMC.

Na Figura 1, encontram-se as diferentes formulações preparadas. Em todas elas os polímeros base apresentam concentrações de 5% w/w, exceto as formulações compostas por PVP (10% w/w) devido a este polímero apresentar menor capacidade de formação de filme em pequenas concentrações. Cada formulação foi preparada solubilizando os polímeros correspondentes em etanol durante 20 minutos sob agitação magnética contínua e à temperatura ambiente. Após se obterem misturas homogêneas, retiraram-se amostras de 10 mL que foram transferidas para placas de petri e colocadas numa estufa, a uma temperatura de 37 °C, para tornar o processo mais rápido. As placas de petri foram previamente revestidas com folhas de silicone para destacar os filmes facilmente. Posteriormente, após a evaporação do etanol, retiraram-se as membranas das placas para caracterização.

Tabela 1. Formulações de PVB, PVP, HPC, HPMC para a produção de filmes poliméricos.

Composições	
Grupo 1	5% w/w PVB
	5% w/w PVB + 1% v/v PEG
	10% w/w PVP + 1% w/w PVB
Grupo 2	10% w/w PVP + 1% w/w PVB + 1% v/v PEG
	10% w/w PVP + 4% w/w PVB
	10% w/w PVP + 4% w/w PVB + 1% v/v PEG
	10% w/w PVP + 1% w/w HPC
	10% w/w PVP + 1% w/w HPC + 1% v/v PEG
	10% w/w PVP + 4% w/w HPC
	10% w/w PVP + 4% w/w HPC + 1% v/v PEG
Grupo 3	5% w/w HPC + 1% w/w PVB
	5% w/w HPC + 1% w/w PVB + 1% v/v PEG
	5% w/w HPC + 4% w/w PVB
	5% w/w HPC + 4% w/w PVB + 1% v/v PEG
	5% w/w HPC + 1% w/w PVP
	5% w/w HPC + 1% w/w PVP + 1% v/v PEG
	5% w/w HPC + 4% w/w PVP
	5% w/w HPC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG
Grupo 4	5% w/w HPMC + 1% w/w PVB
	5% w/w HPMC + 1% w/w PVB + 1% v/v PEG
	5% w/w HPMC + 4% w/w PVB
	5% w/w HPMC + 4% w/w PVB + 1% v/v PEG
	5% w/w HPMC + 1% w/w PVP
	5% w/w HPMC + 1% w/w PVP + 1% v/v w/w PEG
	5% w/w HPMC + 4% w/w PVP
	5% w/w HPMC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG
	5% w/w HPMC + 1% w/w HPC
	5% w/w HPMC + 1% w/w HPC + 1% v/v PEG
5% w/w HPMC + 4% w/w HPC	
5% w/w HPMC + 4% w/w HPC + 1% PEG	

2.2.1. Avaliação da capacidade de pulverização das soluções poliméricas

Numa fase seguinte, foi indispensável avaliar qualitativamente a capacidade de pulverização das soluções e formação de filmes homogêneos sobre lâminas de microscópio. Estas soluções têm como característica serem transparentes portanto, para visualizar melhor a pulverização e a formação das membranas foi necessário incorporar corantes alimentares (azul e verde), colocados no momento da preparação das soluções poliméricas.

2.2.2. Incorporação do fármaco

Para a incorporação de fármaco nas formulações foi utilizada a dexametasona, no qual possui propriedades anti-inflamatórias. O processo de preparação dos filmes com dexametasona incorporada foi realizado de igual forma para os materiais sem fármaco, descrito anteriormente (seção 2.2.). A percentagem deste fármaco em cada solução foi cerca de 3% w/w relativamente à massa de polímero que continha as membranas.

2.3. Métodos de Caracterização

Posteriormente à produção das soluções poliméricas e dos filmes recorreu-se a um conjunto de técnicas analíticas proporcionando a avaliação das várias propriedades dos materiais tais como a solubilidade em soro fisiológico, a adesão a tecidos biológicos, avaliação do índice trombogénico, estudo da viabilidade celular bem como da atividade antibacteriana, entre outros.

Os princípios de funcionamento de cada técnica utilizada são apresentados nas seções seguintes.

2.3.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada

A análise por espectroscopia de infravermelho é uma das técnicas analíticas mais importantes disponíveis atualmente. Esta técnica analítica baseia-se na vibração dos átomos das moléculas, passando um feixe de radiação infravermelho (IV) pela amostra e determinando-se a fração de radiação incidente que é absorvida. Cada grupo funcional absorve energia num dado comprimento de onda, obtendo-se assim o seu espectro particular (Coates, 2006). Deste modo,

este método permite identificar os grupos funcionais existentes em diferentes tipos de amostra, sendo possível conhecer a composição química de cada material (Stuart, 2004).

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

2.3.2. Propriedades térmicas – Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

A análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA) consiste na aplicação de forças oscilatórias a uma determinada amostra, com o intuito de avaliar as propriedades térmicas bem como as mecânicas.

A temperatura de transição vítrea (T_g) foi determinada como sendo o pico em $\tan \delta$, pela Equação 1 (Ferreira, 2007).

$$\tan \delta = \frac{E'}{E''} \quad (1)$$

Sendo que E' e E'' representam o módulo de dissipação e o de armazenamento, respetivamente.

Para esta análise as amostras foram preparadas previamente com dimensão de cerca de 50 × 3 × 1 mm. O equipamento utilizado foi um DMA 242 E *Artemis*, com uma velocidade de aquecimento de 5°C.min⁻¹, em condições de multifrequência (1; 5 e 10 Hz) enquanto que a gama de temperaturas foi entre -40°C e 140°C, utilizando azoto líquido como fluido de arrefecimento (Paar, 2016; NETZSCH, 2015).

2.3.3. Testes de reologia

Para a preparação de sprays é relevante o estudo da reologia para compreender os comportamentos de escoamento por parte de cada amostra de solução polimérica. A reologia é a ciência que estuda o modo como a matéria flui e se deforma de acordo com as leis de elasticidade e viscosidade propostas por *Hooke* e *Newton*, respetivamente (Berg, 2009).

A avaliação do comportamento dos fluidos focou-se na determinação da viscosidade e da tensão de corte, sob a influência da variação da tensão de deformação, tendo sido esta a análise

foi realizada no equipamento *Thermo Scientific HAAKE Phoenix III*. Para este estudo selecionou-se o escoamento entre um cone e um copo, ambas do tipo Z34 DIN Ti. As amostras foram preparadas previamente e foi utilizado um volume de 50 mL de cada solução polimérica.

A viscosidade é uma propriedade quantificável da deformação de um líquido e definida como uma medida de resistência ao fluxo da matéria. O fluido ideal é descrito pela lei básica da viscosidade (Santos F. , 2012):

$$\tau = \dot{\gamma} \times \eta \quad (2)$$

em que τ é a tensão de corte (Pa); $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}) e η é a viscosidade (Pa.s).

Relativamente à tensão de corte é definida como uma força aplicada (F) tangencialmente a uma área (A), sendo que a interface entre a placa superior e o fluido inferior, gera um escoamento na camada líquida, apresentada pela Equação 3 (Santos F. , 2012).

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (3)$$

Para o procedimento experimental definiram-se os parâmetros para a realização dos testes, tais como: a temperatura (T), estabelecida em 37°C, simulando a temperatura fisiológica; a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$), tendo sido selecionada uma gama de valores entre 0,1 a 200 rpm; e o tempo de estudo (t), definido em 360 s. Ao longo destes 360 s a taxa de deformação foi aumentada de 1 até 200 rpm. Após este período, a taxa de deformação foi mantida a 200 rpm por mais 240 s.

2.3.4. Testes de solubilidade em soro fisiológico

Uma das propriedades mais importantes nos filmes sintetizados é a sua capacidade de solubilização em soluções aquosas para facilitar a sua remoção sobre lesões tópicas, sem danificar os tecidos. Desta forma, avaliou-se o comportamento dos materiais em contacto com soro fisiológico (0,9% w/w NaCl) dado que é umas das soluções mais utilizadas para limpar e remover as impurezas das feridas, antes do seu tratamento (Queirós, Santos, Apóstolo, & Rodrigues, 2013).

A primeira fase do teste de solubilização consistiu na preparação de 200 mL de solução de soro fisiológico, no qual continha água destilada e 0,9 % w/w de cloreto de sódio (NaCl). Relativamente à preparação das amostras, foi necessário pesá-las com cerca de 10 mg cada, para certificar que continham todas o mesmo peso no início do teste.

Para avaliar a solubilidade das amostras, estas foram dispostas sobre uma rede de suporte que foi então colocada dentro de um copo de vidro, que já continha a solução preparada de soro fisiológico. Por fim, iniciou-se a agitação da mistura com o auxílio de uma placa de agitação e, simultaneamente, a contagem do tempo necessário à solubilização das amostras, tendo sido feita uma observação da evolução do processo de 2 em 2 minutos.

2.3.5. Testes de adesão em tecidos biológicos

Tendo em conta as aplicações em estudo, uma das características importantes é a adesão dos filmes na superfície dos ferimentos, para a sua proteção. Foi portanto necessário avaliar a capacidade de adesão das membranas em tecidos biológicos.

Para simular a adesão dos materiais aos tecidos biológicos recorreu-se à utilização de carne de porco, com dimensões idênticas e pulverizou-se a mistura polimérica sobre a superfície destas à temperatura ambiente. De seguida, após a secagem da mistura e, simultaneamente, a formação do filme, foi avaliado de forma qualitativa a facilidade de remoção dos filmes formados.

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

Um dos procedimentos mais utilizados para compreender a interação entre um material e a superfície com a qual irá manter contacto é a medição de ângulos de contacto estático (θ) e por seguinte, a determinação das energias de superfície (γ). Desta forma, é possível avaliar o carácter hidrofílico ou hidrofóbico do material mas também o tipo de adesão que ocorrerá resultante da interação com a outra superfície (Yuan & Lee, 2013; Nunes, 2008).

O primeiro passo para a determinação das energias de superfície é a medição dos ângulos de contacto estáticos recorrendo a solventes pré-determinados (Marques, et al., 2015). Neste trabalho foram utilizados três solventes com tensões superficiais conhecidas: água, formamida

e etilenoglicol. Os ângulos de contacto foram medidos no equipamento *OCA 20*, da *Dataphysics*, à temperatura ambiente e foram executadas 5 medições em cada amostra, com cada tipo de solvente.

Posteriormente, através do método indireto de *Owens-Wendt-Rabel e Kaelble*, foi possível calcular as energias de superfície (γ) e as respetivas componentes polares (γ_S^P) e dispersivas (γ_S^D) para cada amostra (Marques, et al., 2015).

2.3.7. Hemocompatibilidade

A avaliação da hemocompatibilidade é um dos estudos mais importantes quando se trata de materiais que permaneçam em contacto com o sangue durante um período de tempo, de acordo com a norma da *International Organization for Standardization (ISO)* – “*ISO 10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices*” (ISO 10993-4, 1999; Ferreira, 2007).

Assim, para analisar os materiais preparados realizaram-se testes *in vitro* para compreender a interação dos materiais com o sangue consoante dois tipos de interação distintos: hemólise e trombogenicidade. Para a execução dos testes utilizou-se sangue de coelho anticoagulado (sangue-ACD) fornecido pela PROBIOLÓGICA. De seguida é descrito o procedimento experimental para a realização destes estudos (Sinclair Research, 2015).

2.3.7.1. Determinação do índice hemolítico

Os testes de hemólise consistem na determinação do índice hemolítico induzido pelo contacto dos materiais com o sangue diluído, libertando-se hemoglobina (Hb) para o plasma durante o tempo em que os materiais estão em contacto com o sangue.

Este procedimento experimental foi executado segundo a norma *American Society for Testing and Materials (ASTM F 756-00)* possibilitando a avaliação da capacidade dos materiais sintetizados em induzirem a rutura da membrana celular dos glóbulos vermelhos (ASTM F 756-00, 2000). De acordo com a norma, o sangue utilizado deve apresentar uma concentração de Hb final de cerca de $10 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg/mL}$. Por sua vez, a concentração de Hb no plasma do sangue amostrado deve ser inferior a 2 mg/mL . Para garantir as concentrações de Hb referidas anteriormente, foi necessário diluir o sangue com uma solução salina tamponizada a pH 7,4 (PBS) (Ferreira, 2007).

Para o teste, os materiais foram sintetizados e preparados com 21 cm² de área superficial e colocados, posteriormente, em tubos de propileno aos quais se adicionaram 7 mL de solução de sangue diluído. Os controlos negativo e positivo consistiram respetivamente em sangue diluído com PBS e sangue diluído no mesmo valor de concentração mas em água.

De seguida, os tubos foram colocados na incubadora cerca de 3 horas, a uma temperatura de 37°C, e ao longo desse tempo foram invertidos delicadamente em períodos de 30 min para promover o contacto de todo o material com o sangue. No final do período de incubação, os tubos foram colocados na centrífuga a 2200 rpm durante 15 min, formando duas fases: sobrenadante (plasma) e componente celular sedimentada e o material da amostra. Para quantificar a concentração de hemoglobina libertada para o sobrenadante recorreu-se ao equipamento espectrofotómetro *UV/Vis Jasco V-550*, determinando a densidades óticas (DO) para cada sobrenadante, a uma absorvância de 540 nm. Por fim, calculou-se a percentagem de hemólise pela Equação 4.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{DO_{\text{teste}} - DO_{\text{cn}}}{DO_{\text{cp}} - DO_{\text{cn}}} \times 100 \quad (4)$$

2.3.7.2. Avaliação da trombogénicidade

O método de avaliação do carácter trombogénico dos materiais consiste no contacto direto entre o sangue-ACD e a superfície dos filmes, averiguando se ocorre formação de coágulos no sangue. Para o procedimento experimental recorreu-se ao método gravimétrico de *Imai e Nose*, que permite a quantificação da massa de trombos formados na superfície do material (Imai & Nose, 1972).

Para a realização do teste prepararam-se três caixas de petri de cada amostra e, seguidamente, adicionaram-se 250 µL de sangue na superfície de cada filme. Como controlo positivo, utilizaram-se três caixas de petri vazias uma vez que o vidro tem um comportamento trombogénico.

Os testes de coagulação iniciaram-se com a adição de 25 µL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1 M previamente preparada ao sangue colocado em cada amostra. Todas as caixas de petri foram de seguida colocadas na estufa, durante 40 min, a uma temperatura de 37°C. No final do tempo definido, as amostras foram retiradas da estufa e foi interrompido o processo

de coagulação com a adição de 5 mL de água destilada. Por fim, a solução obtida em cada caixa de petri e respetivos coágulos formados foram filtrados sob vácuo usando papéis de filtro.

Os coágulos formados foram fixados com a adição de 1 mL de uma solução a 37% de formaldeído. Por fim, todos os papéis de filtro foram colocados na estufa a 37°C, durante 24h. Para determinar a percentagem de massa dos trombos/coágulos formados em cada caso, recorreu-se à Equação 5.

$$\% \text{ massa de coágulos formada} = \frac{m_{cg} - m_{cn}}{m_{cp} - m_{cn}} \times 100 \quad (5)$$

2.3.8. Biocompatibilidade

Biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material e os seus produtos de degradação não originarem respostas adversas no corpo humano (Říhová, 1996). Esta propriedade é uma das mais importantes quando se trata de materiais para a área biomédica, tal como os filmes poliméricos em estudo.

Assim, para avaliar a biocompatibilidade dos materiais é essencial numa primeira abordagem realizar ensaios *in vitro*, avaliando a viabilidade celular e a atividade antibacteriana na presença dos materiais. Os testes realizados ao longo deste trabalho foram executados na Universidade da Beira Interior (UBI, Covilhã), sob a orientação do Professor Ilídio Correia.

2.3.8.1. Estudo da viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar o perfil citotóxico recorreu-se a uma técnica colorimétrica designada por teste MTS, de acordo com o procedimento experimental dos laboratórios da UBI. Assim, para iniciar o estudo do comportamento das células na presença dos diversos filmes, estes foram previamente colocados em placas de 96 poços e esterilizados por exposição a radiação UV durante 1 hora. As células (fibroblastos humanos) foram colocadas em meio de cultura composto por DMEM-F12, suplementado com soro fetal bovino (10% v/v FBS), 100 µg/mL de anfotericina B e 100 µg/mL de gentamicina. Seguidamente, as células foram cultivadas em contacto direto com as amostras a uma densidade de 1×10^4 células por material. O meio de cultura foi substituído a cada 48 horas durante o decorrer do ensaio.

Após cada tempo de incubação (1 e 7 dias), a atividade redox das mitocôndrias das células viáveis foi avaliada através da conversão do MTS num produto *formazan* de cor púrpura solúvel

em água (Alves, et al., 2014). Para isso, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 mL de meio fresco com 20 mL de solução reagente MTS/PBS. De seguida, as células foram incubadas durante 4 horas, a uma temperatura de 37°C, numa atmosfera húmida com 5 % de CO₂. A absorvância foi medida através de um espectrofotómetro de microplacas (*Biorad xMark*), a um comprimento de onda de 492 nm. Por outro lado, foi necessário preparar dois controlos, uma cultura de células na ausência dos filmes foi utilizada como controlo negativo (K⁻) e as células em cultura com adição de etanol (90%) foram utilizadas como controlo positivo (K⁺) (Ribeiro, Morgado, Miguel, Coutinho, & Correia, 2013).

2.3.8.2. Estudo da atividade antibacteriana

Uma das limitações na utilização de biomateriais *in vivo* é a ocorrência de infeções bacterianas. Deste modo, avaliou-se o crescimento bacteriano em contacto com os filmes poliméricos, para compreender se estes apresentam um carácter antibacteriano ou não (Říhová, 1996).

Entre as bactérias existentes, a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), uma bactéria gram-positiva, foi utilizada para estudar a atividade bactericida das membranas pois esta é responsável pela maioria das infeções. O estudo foi iniciado cultivando estirpes (1×10^3 CFU/mL) num meio LB (*Luria-Bertani broth*). Posteriormente, uma fração de 80 µL do inóculo foram adicionados a placas de 96 poços contendo os filmes e 20 µL de resazurina. As microplacas foram seguidamente incubadas durante 24 e 48 horas, a uma temperatura de 37°C.

A resazurina em contacto com células viáveis é metabolizada produzindo irreversivelmente a resofurina que apresenta um comportamento de fluorescência. Deste modo, foi possível quantificar a fluorescência existente utilizando um espectrofluorímetro (*Molecular Devices, Spectramax Gemini XS*), a um comprimento de onda de excitação e emissão de 560 e 590 nm, respetivamente. Relativamente aos controlos de referência, foi utilizado como controlo positivo (K⁺) poços sem qualquer inóculo microbiano e como controlo negativo (K⁻) os poços com inóculo contendo *S. aureus* em meio LB (Alves, et al., 2014).

3. Resultados e Discussão

O trabalho experimental desenvolvido teve como finalidade a preparação de diferentes sprays a partir de diferentes composições, destinando-se a ser aplicados no tratamento de lesões cutâneas.

Esta secção tem como objetivo apresentar os aspetos mais importantes e decisões tomadas em cada etapa do processo de preparação dos sprays e dos respetivos filmes.

3.1. Preparação dos materiais poliméricos

Atualmente não existe muito desenvolvimento relativamente à preparação de sprays de materiais poliméricos para a proteção de ferimentos tópicos. Foi necessário integrar vários conhecimentos das propriedades dos polímeros, bem como os requisitos para este tipo de aplicação. Realizou-se então um estudo preliminar para compreender as características e propriedades dos filmes alterando os tipos de polímeros e as suas concentrações.

Inicialmente, realizaram-se quatro grupos de testes em que as membranas foram preparadas à base de PVB, PVP, HPC e HPMC. Todos os filmes foram avaliados qualitativamente quanto à sua flexibilidade, transparência, facilidade em serem destacáveis sobre a lâmina de microscópio e a sua solubilidade em etanol e em água. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Um dos requisitos essenciais para a escolha das formulações para a aplicação em estudo é a sua elevada solubilidade em água. Observando os resultados obtidos na Tabela 2 pode-se constatar que existem formulações que não possuem essa propriedade. Para a fase seguinte, selecionaram-se apenas os filmes que apresentavam a capacidade de dissolução em soluções aquosas.

Por outro lado, pode-se verificar que as formulações à base de PVP, apesar de apresentarem elevada solubilidade em água, não possuem boas propriedades de formação de filme, não sendo benéfico para este tipo de aplicação. As formulações selecionadas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2. Características obtidas das membranas poliméricas à base de PVB, PVP, HPC e HPMC. Muito pouco/a (-); Pouco/a (-); Bem (+); Muito bem (++).

Composições	Propriedades avaliadas				
	Flexibilidade	Transparência	Solubilidade em etanol	Solubilidade em água	Destacáveis
5% w/w PVB	-	+	+	--	+
5% w/w PVB + 1% v/v PEG	+	+	+	--	+
10% w/w PVP + 1% w/w PVB	+	+	+	-	-
10% w/w PVP + 1% w/w PVB + 1% v/v PEG	+	+	+	-	-
10% w/w PVP + 4% w/w PVB	+	+	+	--	-
10% w/w PVP + 4% w/w PVB + 1% v/v PEG	+	+	+	--	-
10% w/w PVP + 1% w/w HPC	+	+	+	++	--
10% w/w PVP + 1% w/w HPC + 1% v/v PEG	+	+	+	++	--
10% w/w PVP + 4% w/w HPC	+	+	+	++	--
10% w/w PVP + 4% w/w HPC + 1% v/v PEG	+	+	+	++	--
5% w/w HPC + 1% w/w PVB	-	+	+	-	-
5% w/w HPC + 1% w/w PVB + 1% v/v PEG	-	+	+	-	-
5% w/w HPC + 4% w/w PVB	-	+	+	--	-
5% w/w HPC + 4% w/w PVB + 1% v/v PEG	-	+	+	--	-
5% w/w HPC + 1% w/w PVP	+	+	+	++	-
5% w/w HPC + 1% w/w PVP + 1% v/v PEG	++	+	+	++	-
5% w/w HPC + 4% w/w PVP	+	+	+	++	-
5% w/w HPC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG	++	+	+	++	-
5% w/w HPMC + 1% w/w PVB	+	-	+	-	+
5% w/w HPMC + 1% w/w PVB + 1% v/v PEG	+	-	+	-	+
5% w/w HPMC + 4% w/w PVB	-	+	+	--	+
5% w/w HPMC + 4% w/w PVB + 1% v/v PEG	+	+	+	--	+
5% w/w HPMC + 1% w/w PVP	+	+	+	+	+
5% w/w HPMC + 1% w/w PVP + 1% v/v PEG	+	+	+	+	+
5% w/w HPMC + 4% w/w PVP	-	-	+	+	-
5% w/w HPMC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG	-	-	+	+	+
5% w/w HPMC + 1% w/w HPC	-	-	+	+	+
5% w/w HPMC + 1% w/w HPC + 1% v/v PEG	+	+	+	+	+
5% w/w HPMC + 4% w/w HPC	-	-	+	+	+
5% w/w HPMC + 4% w/w HPC + 1% v/v PEG	+	+	+	+	+

3.2. Avaliação da capacidade de pulverização das soluções poliméricas

A avaliação da viabilidade da aplicação das soluções sob a forma de sprays foi realizada tendo em conta que ao pulverizar a solução na superfície, esta não deve derramar para fora da área desejada. O objetivo será que ocorra a formação de um filme com uma espessura considerável, que consiga proteger a ferida mas também que não se solubilize instantaneamente quando em contacto com o sangue. Posto isto, realizaram-se testes às formulações seleccionadas e os resultados encontram-se na Tabela 3. Neste caso, incorporaram-se corantes alimentares (azul e verde) para facilitar a visualização dos filmes produzidos à superfície das lâminas de microscópio.

Tabela 3. Avaliação da capacidade de pulverização das soluções seleccionadas. Muito pouco/a (--); Pouco/a (-); Bem (+); Muito bem (++)

Composições	Capacidade de pulverização
5% w/w HPC + 1% w/w PVP	++ ^(b)
5% w/w HPC + 1% w/w PVP + 1% v/v PEG	++ ^(b)
5% w/w HPC + 4% w/w PVP	-
5% w/w HPC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG	-
5% w/w HPMC + 1% w/w PVP	+
5% w/w HPMC + 1% w/w PVP + 1% v/v PEG	+
5% w/w HPMC + 4% w/w PVP	-- ^(a)
5% w/w HPMC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG	-- ^(a)
5% w/w HPMC + 1% w/w HPC	+
5% w/w HPMC + 1% w/w HPC + 1% v/v PEG	+
5% w/w HPMC + 4% w/w HPC	-- ^(a)
5% w/w HPMC + 4% w/w HPC + 1% v/v PEG	-- ^(a)

(a) Solução muito viscosa

(b) Solução muito diluída

Analisando os resultados obtidos pode-se constatar que as formulações com as proporções gerais de 5:4 ou 5:4:1 apresentam soluções muito viscosas impedindo a pulverização da mesma. Relativamente às formulações com proporções gerais 5:1 ou 5:1:1 possuem viscosidades inferiores, facilitando o processo de pulverização da mistura. No entanto estas formulações estão demasiado diluídas, dificultando a formação de filmes e que permaneçam na zona pretendida.

Por outro lado, também foi possível verificar que as formulações à base de HPC detêm melhores capacidades de pulverização, bem como de formação de filmes, comparativamente

com as restantes amostras. Assim sendo, as formulações mais indicadas para a aplicação em estudo são as soluções com base em HPC.

Como nova estratégia, foi necessário redefinir novas formulações. Assim, alteraram-se as proporções de cada polímero e, posteriormente, testaram-se os sprays até atingir soluções pulverizáveis. Na Tabela 4 encontram-se as composições estudadas e os resultados obtidos relativamente à sua capacidade de pulverização.

Tabela 4. Características obtidas para cada solução polimérica em estudo.

Composições	Capacidade de pulverização
5% w/w HPC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG	Não pulverizou
5% w/w HPC + 3% w/w PVP + 1% v/v PEG	Pulverizou
4% w/w HPC + 4% w/w PVP + 1% v/v PEG	Pulverizou
3% w/w HPC + 3% w/w PVP + 1% v/v PEG	Pulverizou ^(a)
5% w/w HPC + 4% w/w HPMC + 1% v/v PEG	Não pulverizou
5% w/w HPC + 3% w/w HPMC + 1% v/v PEG	Não pulverizou
4% w/w HPC + 4% w/w HPMC + 1% v/v PEG	Pulverizou
3% w/w HPC + 3% w/w HPMC + 1% v/v PEG	Pulverizou

(a) Solução demasiado diluída, não foi utilizada.

Analisando a Tabela 4, as soluções mais adequadas são:

- × **HPC-HPMC(3:3):** 3% w/w de HPC + 3% w/w HPMC + 1% v/v de PEG
- × **HPC-HPMC(4:4):** 4% w/w de HPC + 4% w/w HPMC + 1% v/v de PEG
- × **HPC-PVP(4:4):** 4% w/w de HPC + 4% w/w PVP + 1% v/v de PEG
- × **HPC-PVP(5:3):** 5% w/w de HPC + 3% w/w PVP + 1% v/v de PEG

De realçar que todas as formulações selecionadas incluem 1% v/v de plastificante, para melhorar as propriedades dos filmes. Na Tabela 5, encontram-se os resultados obtidos para cada formulação quanto às propriedades dos filmes preparados a partir das soluções poliméricas desenvolvidas.

Tabela 5. Características obtidas para cada membrana polimérica desenvolvida. Bem (+); Muito bem (++); Excelente (+++).

Composições	Propriedades avaliadas				
	Flexibilidade	Solubilidade em etanol	Solubilidade em água	Destacáveis	Capacidade de pulverização
3% w/w HPC+ 3% w/w HPMC + 1% v/v PEG	++	++	++	+++	+++
4% w/w HPC+ 4% w/w HPMC + 1% v/v PEG	++	++	++	+++	++
4% w/w HPC+ 4% w/w PVP + 1% v/v PEG	+++	+++	+++	++	+++
5% w/w HPC+ 3% w/w PVP + 1% v/v PEG	+++	+++	+++	++	++

Na Figura 7, é possível analisar a aparência visual de cada filme, após a sua pulverização.

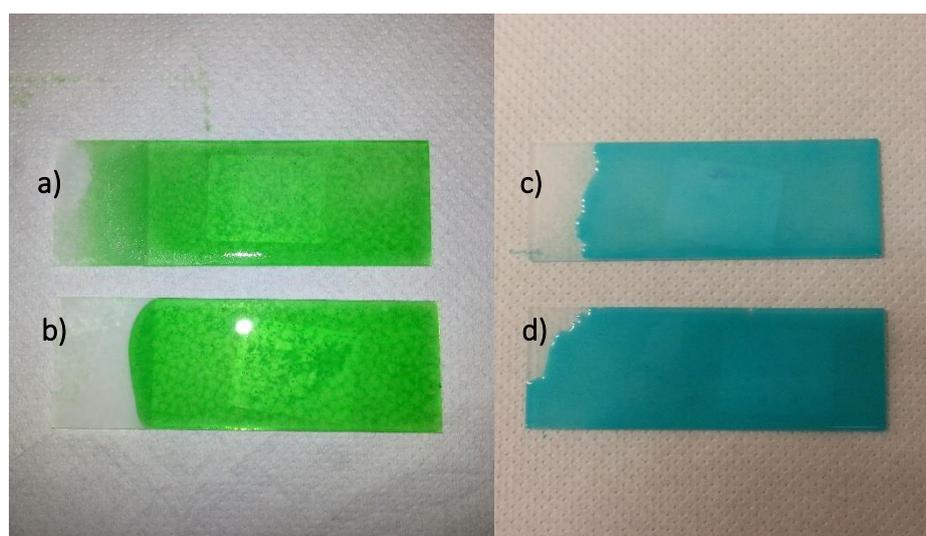


Figura 7. Fotografias dos filmes desenvolvidos: a) HPC-HPMC(3:3); b) HPC-HPMC(4:4); c) HPC-PVP(4:4); d) HPC-PVP(5:3).

3.3. Avaliação das propriedades dos sprays e dos filmes correspondentes

Uma vez obtidas as soluções e as respectivas membranas poliméricas foi necessário avaliar as propriedades químicas, mecânicas, físicas, térmicas e biológicas. Deste modo, será possível compreender o desempenho dos materiais para a aplicação em estudo. Assim, nas próximas secções apresentam-se os resultados obtidos na caracterização efetuada, estabelecendo sempre um enquadramento com a aplicação pretendida.

3.3.1. Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada

A técnica FTIR-ATR consiste na identificação dos grupos funcionais presentes em cada amostra. Neste caso, as quatro amostras sintetizadas não apresentam alterações na sua composição, visto que não ocorreu reação nem modificação nos grupos funcionais. Assim, os espectros obtidos têm características muito semelhantes. Este método serviu como teste inicial de controlo de qualidade aos polímeros utilizados, analisando apenas que não ocorre alteração na sua composição dos polímeros aquando da formação dos filmes.

Os espectros resultantes da análise FTIR-ATR para as quatro amostras dos filmes sintetizados estão apresentados na Figura 8.

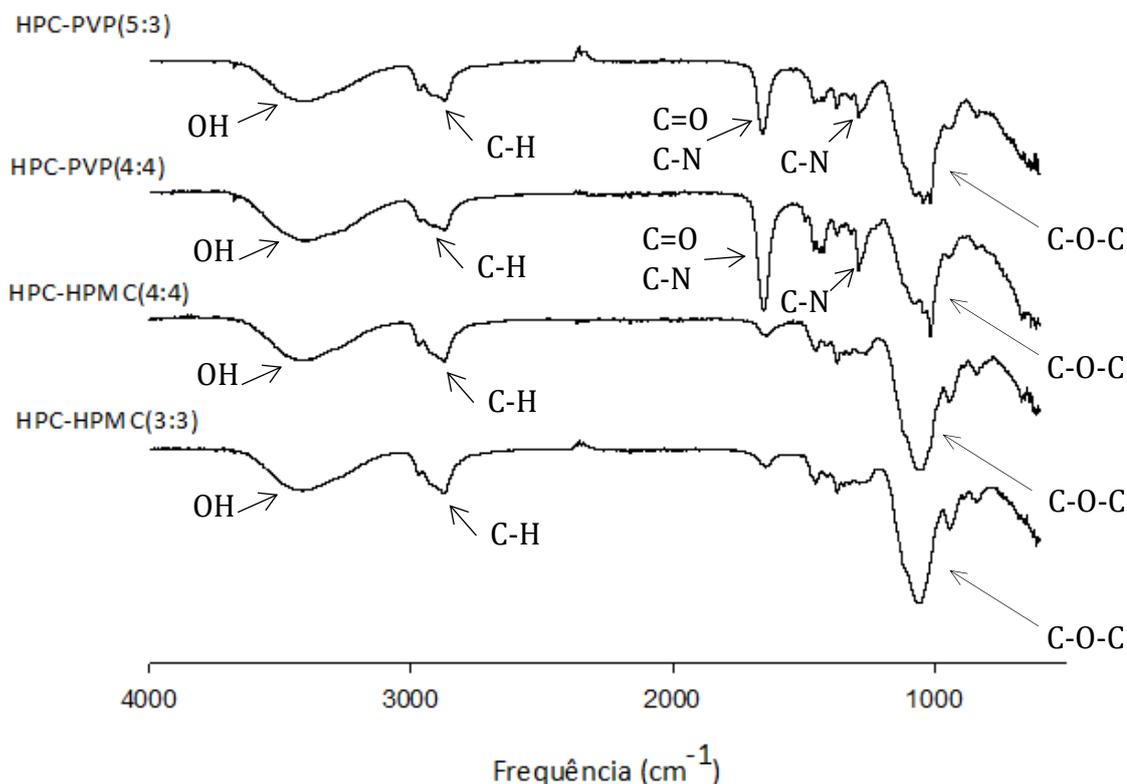


Figura 8. Espectros ATR-FTIR de HPC-HPMC(3:3), HPC-HPMC(4:4), HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3).

Observando os espectros correspondentes aos quatro filmes desenvolvidos pode-se confirmar que estes são semelhantes, visto que todas as membranas são produzidas com base no mesmo polímero, hidroxipropilcelulose (HPC). Deste modo, os espectros apresentam as bandas características de HPC, bem como dos polímeros incorporados como HPMC, PVP e PEG.

Tal como foi exposto anteriormente (capítulo 1, seção 1.2.1), os polímeros HPC e HPMC têm na sua estrutura química grupos funcionais semelhantes tais como ligações carbono-carbono (C-C), álcoois (OH) e éteres (C-O-C). O polímero PVP possui ligações C-C mas também ligações C-N e C=O. Relativamente ao plastificante PEG, este possui apenas ligações carbono-carbono e grupos OH. Assim sendo, é possível verificar esses mesmos grupos em bandas características ao longo dos espectros. Uma das bandas é a banda presente na zona de 3200-3600 cm^{-1} que corresponde à elongação característica dos grupos OH, bem como a banda característica que corresponde à ligação éter (C-O-C), na zona 1070-1200 cm^{-1} .

Analisando os espectros, pode-se comprovar que o HPC-HPMC(3:3) e HPC-HPMC(4:4) apresentam espectros idênticos pois foram preparados com os mesmos polímeros (HPC, HPMC e PEG) mas em concentrações diferentes, não afetando significativamente os espectros. Similarmente, as amostras HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3) também geram espectros idênticos entre si, pelo mesmo motivo.

Contudo, observando a Figura 8 pode-se constatar que a principal diferença entre as amostras base HPC-HPMC e as HPC-PVP incide-se na banda característica na zona 1600-1700 cm^{-1} , no qual os filmes base HPC-PVP apresentam bandas mais intensas. Esta diferença deve-se ao facto de o polímero PVP exibir na sua estrutura química os grupos C=O e C-N, sendo responsáveis por maior intensidade nessas bandas.

Por outro lado, também é possível verificar que os filmes base HPC-HPMC apresenta banda característica do grupo éter (C-O-C) com intensidade ligeiramente superior aos filmes base HPC-PVP.

3.3.2. Propriedades térmicas - Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

A técnica de análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA) é a mais indicada para avaliar as propriedades térmicas e viscoelásticas, devido à sua elevada sensibilidade comparativamente com outras técnicas mais convencionais. Esta técnica tem como propósito obter informação acerca das propriedades mecânicas e térmicas dos materiais, com a utilização de forças oscilatórias que permitem medir a deformação resultante, a uma gama de temperaturas estipulada e controlada.

As amostras foram sujeitas a três tipos de frequências (1; 5 e 10 Hz) e a uma gama de temperaturas de -40°C a 140°C no caso das amostras base HPC-HPMC e entre -40°C a 60°C para

as amostras base HPC-PVP. As curvas de $\tan \delta$ em função da temperatura para cada amostra encontram-se representadas nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

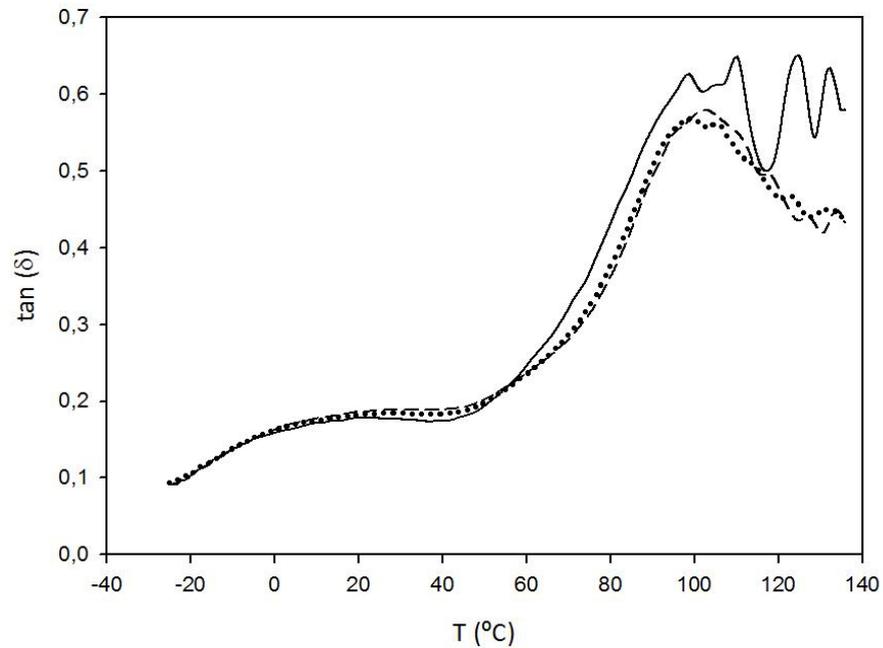


Figura 9. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-HPMC(3:3). Frequências: 1 Hz (—); 5 Hz (.....) e 10 Hz (- - - - -).

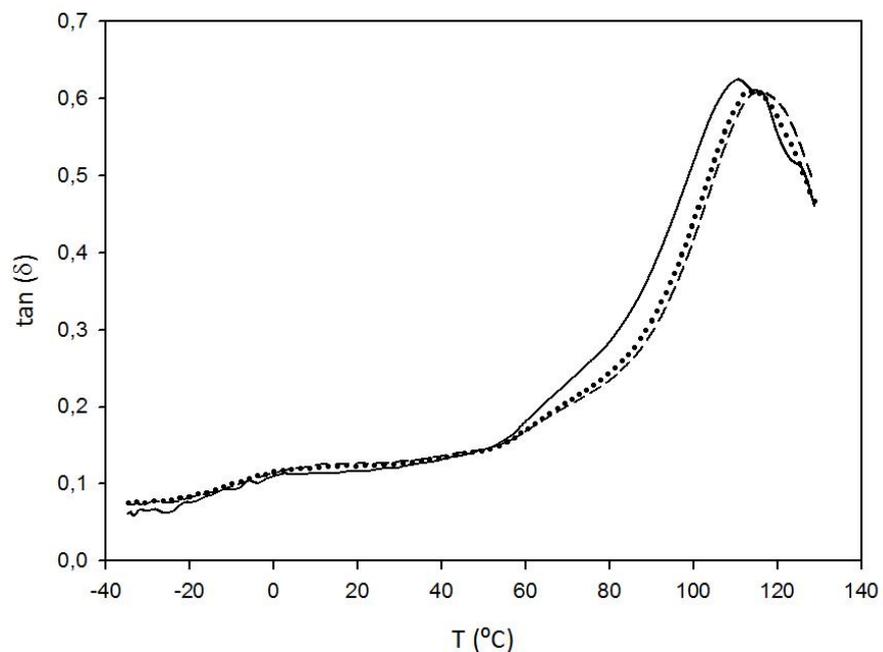


Figura 10. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-HPMC(4:4). Frequências: 1 Hz (—); 5 Hz (.....) e 10 Hz (- - - - -).

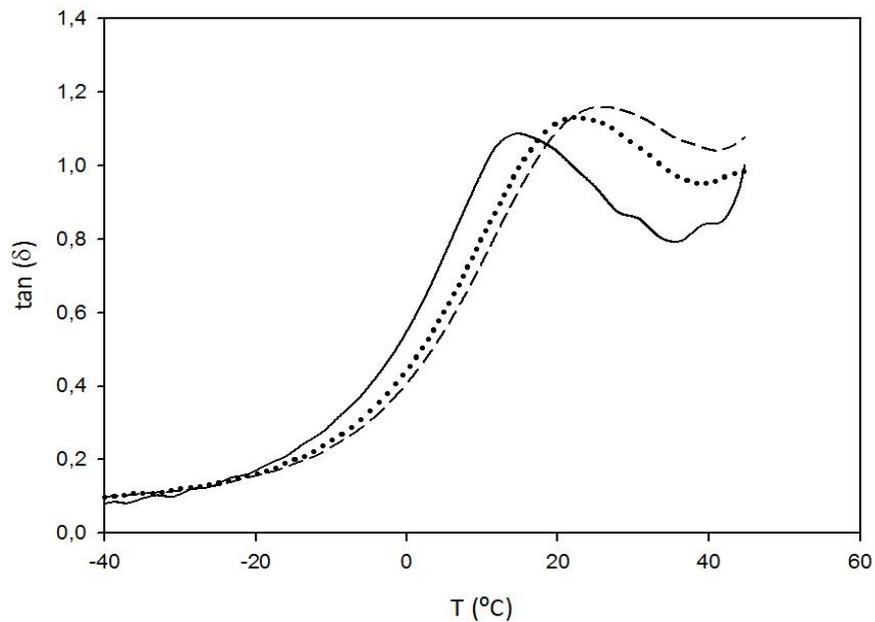


Figura 11. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-PVP(4:4). Frequências: 1 Hz (—); 5 Hz (.....) e 10 Hz(- - - - -).

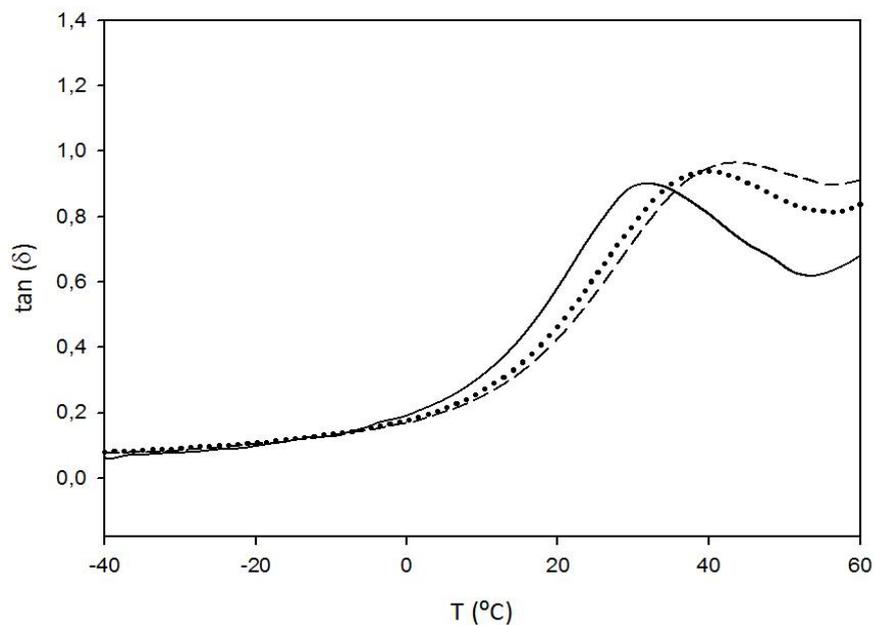


Figura 12. Traços de $\tan \delta$ em função da temperatura para HPC-PVP(5:3). Frequências: 1 Hz (—); 5 Hz (.....) e 10 Hz(- - - - -).

Observando os resultados obtidos nas Figuras 9 e 10, estas amostras apresentam T_g com valores de 108 e 111°C, respectivamente. A literatura reporta que a temperatura de transição vítrea pode ser afetada diretamente devido às características das estruturas químicas das unidades de repetição dos polímeros tais como as interações polares, ligações cruzadas entre as cadeias, grupos rígidos (grupos aromáticos, éter, hidrocarbonetos,..) nas cadeias principais,

entre outros (Mafi, Mirabedini, Attar, & Moradian, 2005). Por outro lado, as amostras HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3) possuem valores de T_g muito baixos relativamente aos filmes anteriores, 14 e 32°C respetivamente, tal como pode ser verificado nas Figuras 11 e 12. Assim sendo, pode-se concluir que os polímeros HPMC e PVP combinados com o HPC, permitem obter filmes com propriedades mecânicas muito distintas. A HPC apresenta uma estrutura com zonas amorfas de baixo T_g em paralelo com os seus domínios cristalinos, o que resulta numa estrutura com elevada mobilidade, e consequentemente baixo valor de T_g (Sarode, Wang, Cote, & Worthen, 2013). O polímero HPMC possui grupos aromáticos e grupos éter nas cadeias principais, não permitindo a movimentação das cadeias e, consequentemente, os filmes apresentam elevada rigidez, o que justifica o maior valor final de T_g . Outro fator que contribui para T_g elevado é o estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os polímeros HPC e HPMC diminuindo a mobilidade das cadeias e assim aumenta a rigidez. Em contrapartida, o polímero PVP não possui na cadeia principal grupos rígidos, permitindo maior flexibilidade entre as cadeias. As características de cada polímero e as suas respetivas estruturas químicas podem ser observadas no capítulo 1, na seção 1.2.1. Por outro lado, com o aumento das frequências verifica-se um aumento da T_g , fenómeno expectável.

3.3.3. Testes de reologia

Para avaliação do comportamento de cada solução polimérica desenvolvida recorreu-se ao estudo da reologia com base na análise da deformação e escoamento dos fluidos. Desta forma, definiram-se três parâmetros no equipamento: temperatura, taxa de deformação e tempo. Utilizando o reómetro rotativo observaram-se os perfis da viscosidade e da tensão de corte em função da taxa de deformação, utilizando velocidades de rotação entre 0,1 e 200 rpm. Este teste decorreu à temperatura de 37°C, simulando a temperatura fisiológica.

Nas Figuras 13 e 14 apresentam-se os resultados obtidos para cada uma das soluções.

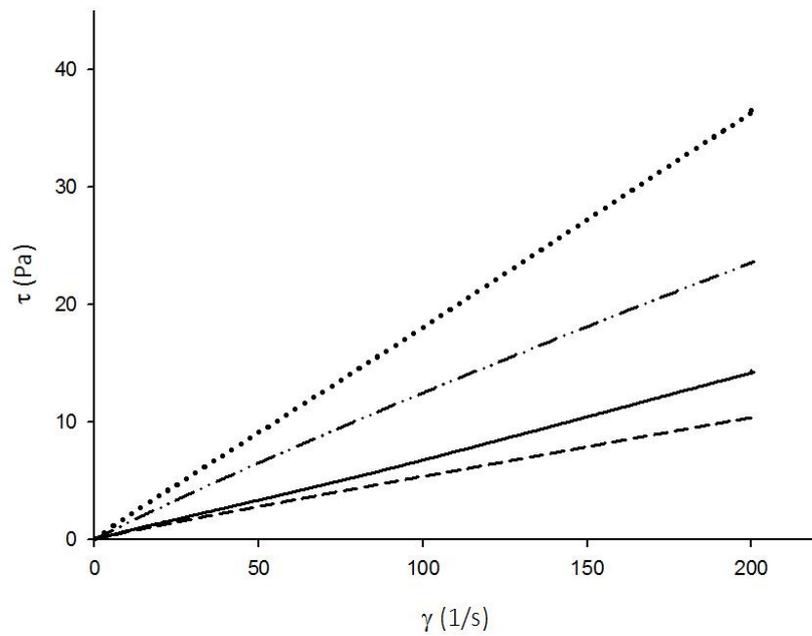


Figura 13. Perfis da tensão de corte de acordo com a variação da taxa de deformação para o HPC-HPMC(3:3) (—); para o HPC-HPMC(4:4) (·····); para o HPC-PVP(4:4) (-----) e para o HPC-PVP(5:3) (-·-·-·-).

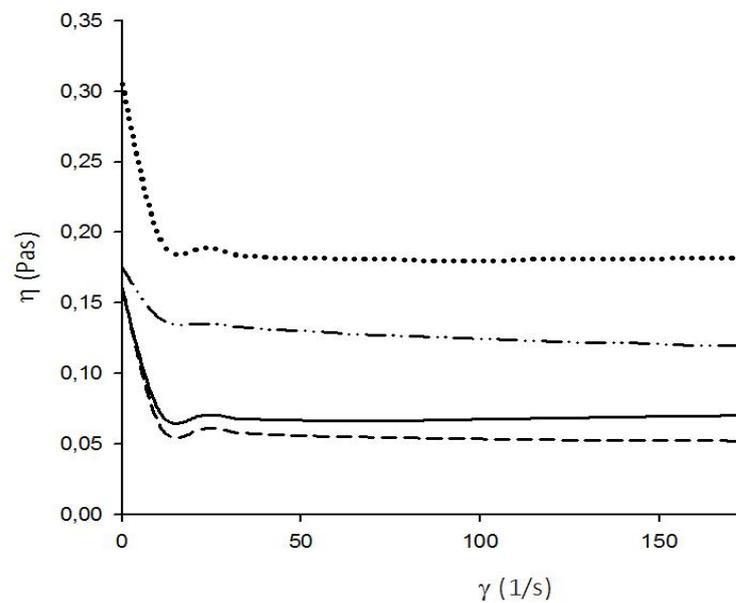


Figura 14. Perfis da viscosidade de acordo com a variação da taxa de deformação para o HPC-HPMC(3:3) (—); para o HPC-HPMC(4:4) (·····); para o HPC-PVP(4:4) (-----) e para o HPC-PVP(5:3) (-·-·-·-).

Com base na Figura 13 é possível concluir que os fluidos exibem um comportamento newtoniano (comportamento ideal) pois a tensão de corte é diretamente proporcional à taxa de deformação, uma das características básicas deste tipo de fluidos (Santos F. , 2012).

Relativamente à Figura 14, verifica-se que as curvas de viscosidade indicam esse mesmo comportamento de fluido newtoniano, devido ao facto que a viscosidade não é afetada pelas variações na taxa de deformação, tendo-se mantido constante. Assim, com os resultados obtidos nas Figuras 13 e 14, conclui-se que as amostras têm um comportamento ideal o qual é independente da taxa de deformação aplicada (Santos F. , 2012).

Na Tabela 6 apresentam-se os valores de viscosidade adquiridos por este método, para cada amostra.

Tabela 6. Valores das viscosidades para cada solução polimérica desenvolvida.

Amostras	η (Pa.s)
HPC-HPMC(3:3)	$\approx 0,07$
HPC-HPMC(4:4)	$\approx 0,18$
HPC-PVP(4:4)	$\approx 0,05$
HPC-PVP(5:3)	$\approx 0,11$

Comparando os valores de viscosidade das membranas HPC-HPMC(4:4) e HPC-PVP(4:4), no qual apenas diferem no tipo de polímeros utilizados (HPMC e PVP), observa-se que são bastante distintas. O HPC-HPMC(4:4) apresenta uma viscosidade mais elevada do que o HPC-PVP(4:4), uma vez que os polímeros HPMC e PVP possuem propriedades viscoelásticas diferentes, afetando diretamente nas viscosidades das soluções. Assim, constatou-se que o comportamento reológico das soluções é influenciado pelos polímeros utilizados e pelas suas concentrações em cada formulação.

Para a pulverização apropriada das soluções poliméricas, estas devem apresentar valores de viscosidade entre 0,014 Pa.s e 0,2 Pa.s (US Patente Nº 6,432,415, 2002; 3M, 2014). Observando os valores obtidos, pode-se concluir que as viscosidades são adequadas ao propósito.

3.3.4. Testes de solubilidade em soro fisiológico

Para a aplicação em estudo, uma das propriedades exigidas é a capacidade de solubilização dos filmes em soluções aquosas para facilitar a sua remoção à superfície da pele, sem danificar os tecidos. Posto isto, foi necessário avaliar essa capacidade de dissolução e analisar o tempo necessário para solubilizar cada amostra. Na Figura 15 encontra-se a sequência de acontecimentos durante a avaliação da solubilidade dos materiais em soro fisiológico.

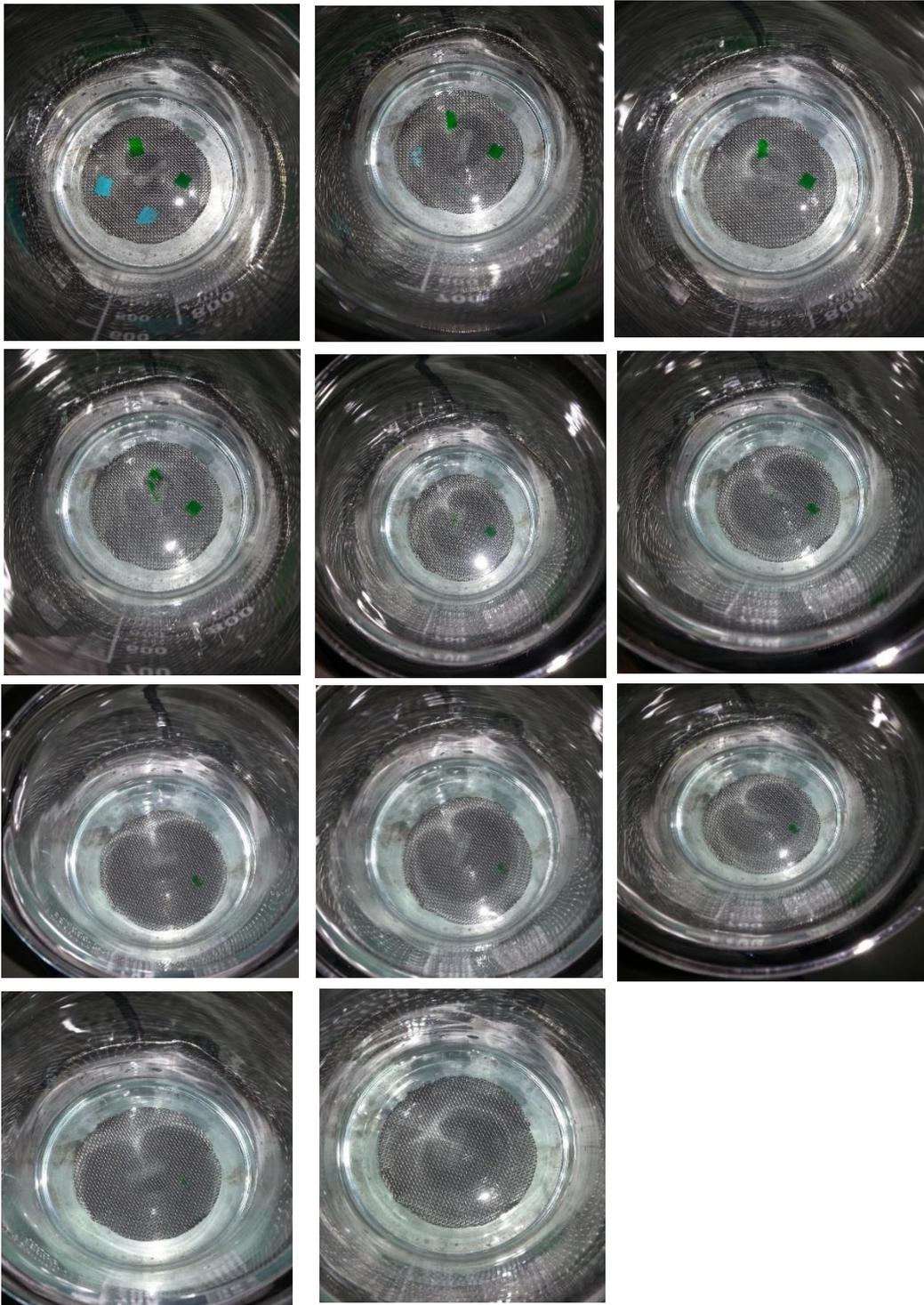


Figura 15. Processo de solubilização das amostras em soro fisiológico, cerca de 2 em 2 min.

O teste de solubilização decorreu durante 22 min, tendo sido feita uma observação da evolução do processo de solubilização de 2 em 2 minutos. Os resultados indicam que a solubilidade dos materiais não é semelhante, devido às diferenças das propriedades dos filmes. Na Tabela 7 encontram-se os tempos de solubilização de cada material.

Tabela 7. Tempos de solubilização para cada filme desenvolvida.

Composições	Tempo de solubilização (min)
HPC-HPMC(3:3)	12
HPC-HPMC(4:4)	21
HPC-PVP(4:4)	3
HPC-PVP(5:3)	4

Pelos resultados obtidos pode-se constatar que os filmes apresentam tempos de solubilidade bastante distintos. Os filmes que contêm o PVP na sua constituição possuem uma capacidade de solubilização em soro fisiológico muito elevada, ocorrendo a dissolução em apenas em 3-4 minutos. Em contrapartida, as membranas que possuem o polímero HPMC na sua formulação apresentam tempos de solubilidade superiores visto que este polímero possui menor capacidade de solubilidade em soluções aquosas do que o PVP. Contudo, durante o teste, foi possível verificar que as membranas formam inicialmente géis, permanecendo no local durante cerca de 8-10 minutos antes da solubilização ser completa.

Assim, pode-se concluir que será possível remover facilmente os filmes HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3) sobre as áreas afetadas com o auxílio de soro fisiológico. Todavia, a elevada capacidade de solubilização pode-se tornar numa limitação pois as membranas estarão em contacto com o sangue, podendo dificultar o processo de formação dos filmes e a sua estabilidade. Relativamente aos filmes HPC-HPMC(3:3) e HPC-HPMC(4:4), estes conseguirão permanecer no local durante mais tempo pois não se solubilizarão de imediato, podendo ser benéfico em lesões tópicas que possam conter alguma hemorragia.

3.3.5. Testes de adesão em tecidos biológicos

Para testar a capacidade de adesão dos filmes foram utilizadas tiras de carne de porco para simular a ligação dos filmes aos tecidos biológicos humanos.

A fim de perceber a adesão e o aspeto dos materiais quando aplicados sobre substrato biológico, apresenta-se na Figura 16 a aparência visual dos filmes após a pulverização das soluções e, posteriormente à secagem das mesmas sobre a carne.

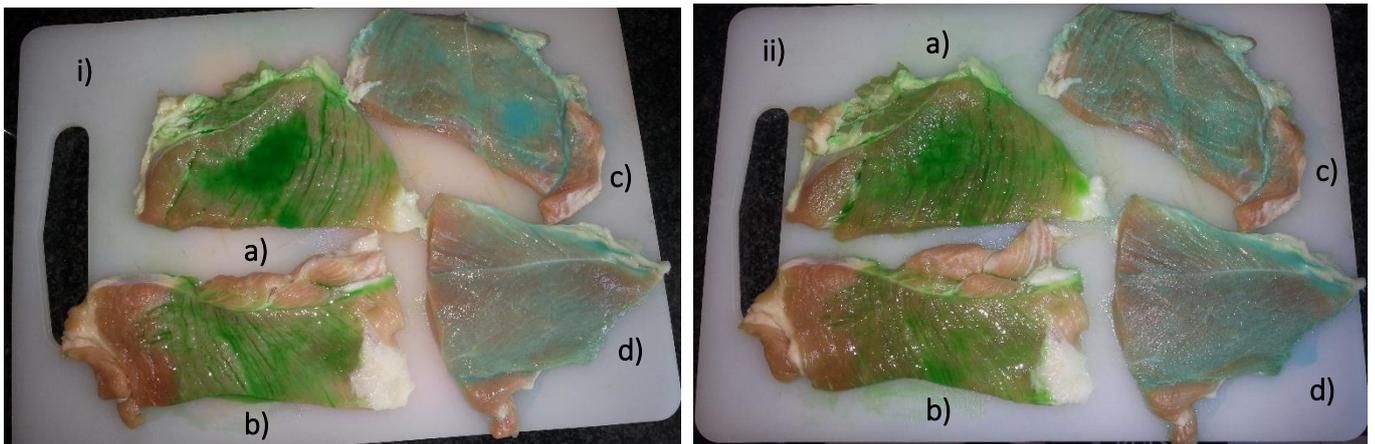


Figura 16. Fotografias dos filmes desenvolvidos: i) após a sua pulverização; ii) após a sua secagem: a) HPC-HPMC(3:3); b) HPC-HPMC(4:4); c) HPC-PVP(4:4) e d) HPC-PVP(5:3)

Analisando as fotografias da Figura 16, verifica-se que a pulverização das soluções originam filmes com características diferentes. As amostras HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3) apresentam membranas com uma espessura reduzida, no qual revestem toda a superfície da carne de forma homogênea. Referente aos filmes HPC-HPMC(3:3) e HPC-HPMC(4:4) pode-se verificar que concebem membranas gelatinosas, uma vez que estas conseguem absorver uma certa quantidade de água existente à superfície da carne. Em geral, foi possível constatar que todos aderiram muito bem aos tecidos biológicos, não sendo possível retirá-los, apenas por ação mecânica uma vez secos.

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

Tendo em conta a aplicação em estudo, as soluções poliméricas serão aplicadas sobre a superfície da pele com o intuito de proteger ferimentos. Assim, é fundamental avaliar as propriedades superficiais destes filmes, ou seja, as interações entre os materiais e superfícies como a pele e o sangue. Desta forma, determinaram-se as energias de superfície para cada amostra para compreender se estes possuem capacidade de adesão neste tipo de compostos biológicos.

Para cada material, mediram-se os ângulos de contacto estáticos (Θ) utilizando solventes como a água, formamida e etilenoglicol, com tensões superficiais conhecidas. Por conseguinte, foi

possível determinar as energias de superfície e as suas respetivas componentes polares e dispersivas através do método indireto *Owens-Wendt-Rabel e Kaelble*. (Alves, et al., 2014)

Deste modo, mediante o cálculo das energias de superfície para cada filme desenvolvido é imprescindível verificar se estes cumprem o princípio termodinâmico, em que o material para conseguir manter a adesão a um substrato, a sua energia de superfície deve ser menor ou igual à desse substrato (Marques, et al., 2015). Os resultados obtidos para cada um dos fatores determinados encontram-se apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de energia de superfície e correspondentes componentes dispersivas e polares para os filmes poliméricos desenvolvidos, pele e sangue.

Substrato	Energias de superfície e tensões superficiais (mN/m)		
	γ_s	γ_s^d	γ_s^p
Pele ^(a)	43,7	35,7	8,0
Sangue	47,5	11,2	36,3
HPC-HPMC(3:3)	23,02 ± 2,2	5,04 ± 0,8	17,98 ± 2,1
HPC-HPMC(4:4)	30,1 ± 2,6	1,34 ± 0,4	28,8 ± 2,5
HPC-PVP(4:4)	21,8 ± 3,0	6,8 ± 1,4	15,0 ± 2,6
HPC-PVP(5:3)	26,6 ± 2,0	2,6 ± 0,5	24,0 ± 1,9

(a) Valores relativamente à pele seca

Analisando os valores obtidos conclui-se que todos os materiais possuem uma energia de superfície muito inferior aos valores dos substratos logo, estes materiais têm a capacidade de aderir com eficácia ao sangue e à pele. Assim, pode-se constatar que as forças de adesão entre as membranas e os substratos serão superiores às forças de coesão, garantindo deste modo a proximidade intermolecular entre a superfície de aplicação e o filme (Morgado, 2015).

Além disso, as componentes polares dos filmes são muito superiores às suas componentes dispersivas, o que significa que as principais interações entre os materiais e os substratos serão do tipo de interações entre dipolos permanentes, entre dipolos e dipolos induzidos e pontes de hidrogénio. Analisando os valores obtidos dos materiais, pode-se concluir que não ocorrerá interações fortes entre filmes/pele, pois a pele apresenta valores muito elevados de componente dispersiva comparativamente com os materiais. Contudo, para aplicação em estudo, os materiais serão colocados sobre a pele húmida, o que faz com que aumente a

componente polar do substrato e permitindo uma melhor interação com os filmes poliméricos. Consequentemente, é possível sugerir que, de acordo com os resultados obtidos, os filmes conseguirão aderir eficazmente às superfícies dos ferimentos.

3.3.7. Hemocompatibilidade

Os materiais desenvolvidos ao longo deste trabalho, têm como propósito serem colocados sobre a superfície da pele e formar um filme que consiga estancar a hemorragia e proteger a ferida. Deste modo, é necessário simular e compreender quais os fenómenos que se desencadeiam após a sua aplicação (Braune, Grunze, Straub, & Jung, 2013). O primeiro fenómeno consiste na absorção das proteínas à superfície dos filmes e, consequentemente, desencadeia a adesão de plaquetas e ativação de mecanismos de coagulação que levam à formação de trombos (Beugeling, 1979; Sant'ana, 2013). Assim, a partir destes estudos é possível compreender os fenómenos envolvidos na interface material/sistema biológico.

A avaliação da hemocompatibilidade realizada neste trabalho teve como objetivo avaliar o carácter trombogénico e o índice hemolítico dos materiais segundo a norma *International Organization for Standardization* (ISO) 10993-4 (ISO 10993-4, 1999). Para realização destes testes recorreu-se ao uso de sangue de coelho anticoagulado (sangue-ACD), como descrito na seção 2.3.7.

3.3.7.1. Determinação do índice hemolítico

O processo de hemólise envolve a destruição da membrana celular dos glóbulos vermelhos, podendo ser provocada quando os materiais ficam em contacto com o sangue, libertando-se a hemoglobina para o meio (plasma). Deste modo, realizaram-se testes para compreender a interação sangue/material determinando os índices hemolíticos dos materiais (Santos J. , 2014).

No decorrer do estudo, foi possível verificar que após a centrifugação, a solução de plasma detinha uma cor quase transparente, o que significa que não ocorreu libertação de hemoglobina por hemólise, mas também apresentava turbidez. Esse fenómeno de turbidez resulta da solubilização do filme dissolvido no sobrenadante pois, tal como foi apresentado anteriormente (capítulo 2, seção 2.3.4.), os filmes são bastante solúveis em soluções aquosas.

Um dos objetivos deste estudo é a quantificação de hemoglobina libertada por medição das densidades óticas do sobrenadante. Neste caso, não foi possível avaliar quantitativamente as soluções de sobrenadante, devido ao facto de o espectrofotómetro contabilizar não só a hemoglobina presente bem como o polímero dissolvido, apresentando valores elevados de DO que não correspondiam a hemólise.

No entanto, avaliando os materiais qualitativamente, pode-se sugerir que não aparentam possuir um carácter hemolítico, uma vez que apresentaram sobrenadantes praticamente com cor transparente, o que indica inexistência ou baixos valores de hemólise.

3.3.7.2. Avaliação da trombogenicidade

A avaliação da trombogenicidade foi realizada colocando as amostras em contacto direto com uma certa quantidade de sangue durante um período de tempo estipulado, com o objetivo de verificar se ocorre alteração e formação de trombos no sangue. A avaliação do carácter trombogénico foi realizada de acordo com o método gravimétrico de *Imai e Nose*, no qual é possível contabilizar a massa de coágulos formados na superfície dos filmes quando em contacto com o sangue (Imai & Nose, 1972; Ferreira, 2007; Santos R. , 2010). Se o material apresentar um carácter trombogénico significa que este, em contacto com o sangue, poderá auxiliar no processo de coagulação e de cicatrização. Neste caso, é uma das características fundamentais para a sua utilização na aplicação em estudo.

O procedimento utilizado neste teste encontra-se descrito no capítulo 2, seção 2.3.7. A massa de coágulos formados na superfície do material foi determinada após 45 min de contacto com o sangue-ACD. Na Figura 17 estão representados os resultados obtidos relativamente à percentagem de massa de trombos formados.

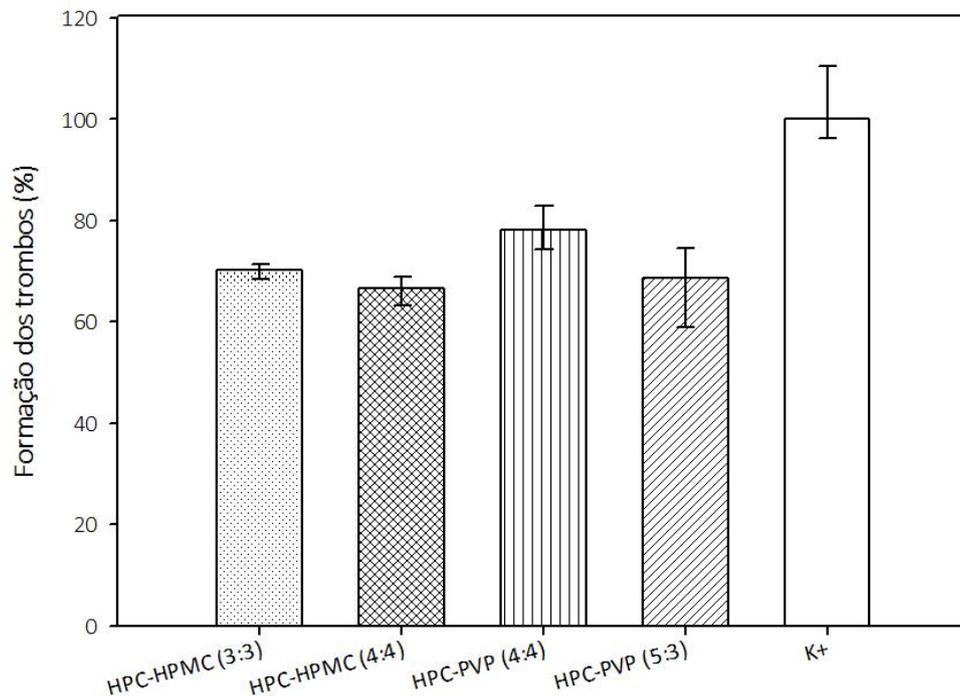


Figura 17. Valores de massa (%) dos trombos formados na superfície das membranas, após 45 min de contato do sangue. Valores obtidos representam a média de três amostras; K+, controlo positivo.

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que as membranas têm um carácter trombogénico, apresentando valores de formação de trombos médios entre 67% e os 78%. De realçar que estes materiais são muito solúveis em soluções aquosas, como foi descrito anteriormente. Assim sendo, ao colocar os materiais em contacto com o sangue para a avaliação da trombogénica, estes filmes iniciam o processo de solubilização. Na fase de retirar o coágulo para o papel de filtro, não foi possível recolher a totalidade da massa de trombos formados pois iria arrastar polímero e influenciaria os resultados finais. Deste modo, as percentagens de formação de trombos não estão tão próximas do controlo positivo devido às dificuldades associadas no recolher dos trombos formados na superfície dos materiais.

Analisando a Figura 17, verifica-se que as diferenças entre o carácter trombogénico das diferentes amostras não são significativas, o que está de acordo com o facto de os valores de energia de superfície dos materiais serem baixas e semelhantes entre si. Segundo a literatura, a trombogénica de um material está diretamente relacionado com a sua energia de superfície. Materiais que apresentem energias de superfície inferiores têm a tendência a serem

mais trombogénicos, dado que as proteínas aderem em maior quantidade, promovendo o processo de coagulação (Correia, et al., 2016; Santos, et al., 2015).

Tendo em conta a aplicação em estudo pode-se constatar que estes materiais têm a capacidade auxiliar o estancamento da hemorragia, auxiliando no processo de coagulação e de cicatrização dos tecidos.

3.3.8. Biocompatibilidade

Uma das propriedades fulcrais para a utilização dos sprays em contacto com sistemas biológicos é a sua biocompatibilidade, definindo-se como a capacidade do material não desencadear reações inflamatórias, tóxicas e alérgicas, quando em contacto com os tecidos vivos (Santos J. , 2014).

Deste modo, foi avaliado o comportamento *in vitro* dos materiais a partir da determinação da viabilidade celular, bem como da atividade antibacteriana recorrendo à estirpe *S. aureus*. Estes estudos realizaram-se na Universidade da Beira Interior (UBI), de acordo com os protocolos da instituição.

3.3.8.1. Estudo da viabilidade celular

O estudo da citotoxicidade consistiu na utilização de fibroblastos humanos em contacto direto com os filmes poliméricos, para compreender a resposta fisiológica das células, com base no teste calorimétrico MTS. Inicialmente, colocaram-se os materiais em contacto com as células vivas que foram posteriormente, incubadas numa solução reagente de MTS/PBS, tendo sido o meio substituído a cada 48 horas durante o decorrer do ensaio. As células viáveis conseguem metabolizar o MTS nas suas mitocôndrias num produto *formazon* de cor púrpura, obtendo-se uma solução colorida (Alves, et al., 2014). Para quantificar as células viáveis existentes na solução, realizou-se a leitura da absorvância num espectrofotómetro, a 492 nm. Quanto maior a absorvância, maior será o número de células viáveis.

Para este estudo utilizaram-se amostras preparadas com e sem dexametasona, para perceber se apresentam diferenças com a incorporação do fármaco. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 18.

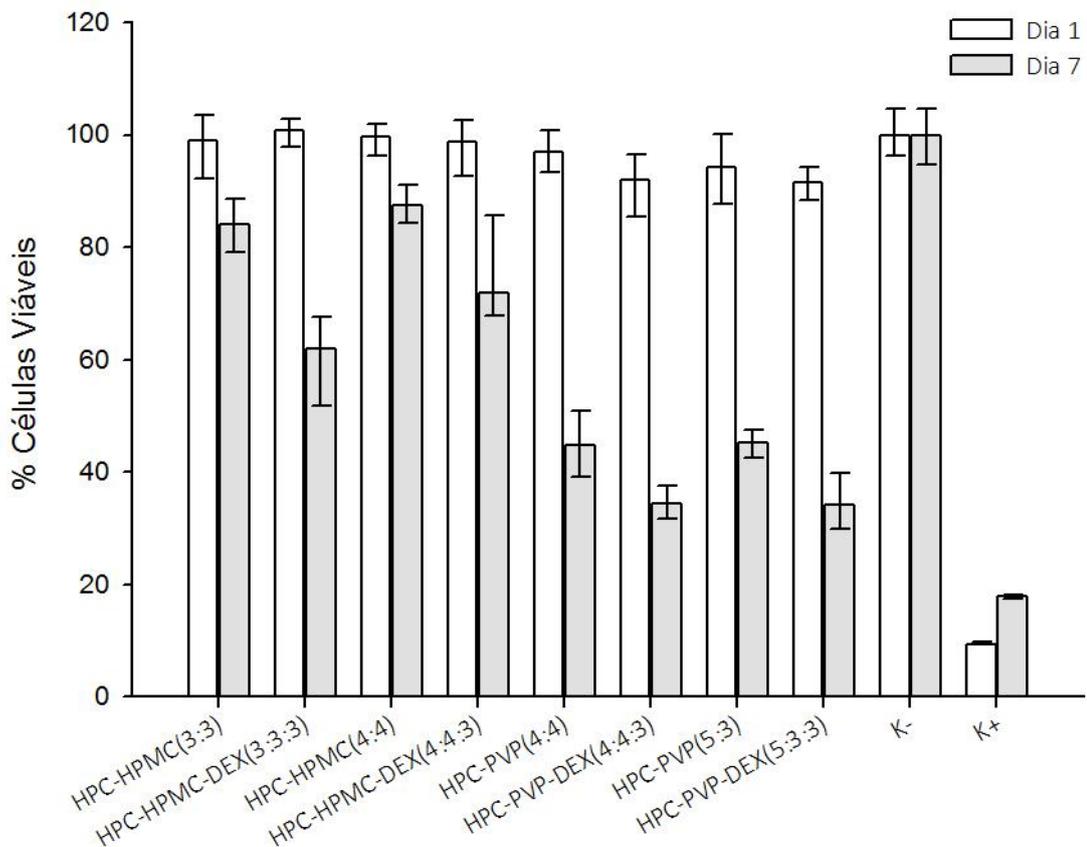


Figura 18. Avaliação da atividade celular durante sete dias de contacto com os filmes. K⁻, controlo negativo; K⁺, controlo positivo.

Observando a Figura 18, é possível concluir que, às primeiras 24h de incubação todos os materiais são biocompatíveis, obtendo valores de viabilidade celular de cerca de 99%.

Centrando nos resultados após sete dias de ensaio, pode-se observar que os materiais apresentam valores muito distintos entre o primeiro e o sétimo dia de ensaio, verificando-se uma diminuição na quantidade de células viáveis. Contudo, os materiais contendo HPMC apresentam uma diminuição menos acentuada, proximamente 85% de células viáveis, tornando-se mais promissores para a aplicação em estudo.

Relativamente aos materiais com dexametasona na sua constituição, estes apresentam valores inferiores de viabilidade celular que os materiais sem fármaco, concluindo que estes não melhoram o comportamento das células em contacto com os filmes. Estes resultados sugerem

que a concentração de dexametasona utilizada poderá ter sido excessiva para a massa de filmes, ou seja, a dexametasona está demasiado concentrada.

Contudo, para a aplicação em estudo, o tempo de exposição dos filmes desenvolvidos na superfície da pele será bastante reduzido, reduzindo-se a poucas horas, o que significa que os resultados obtidos não indicam a impossibilidade do seu uso.

3.3.8.2. Estudo da atividade antibacteriana

O uso de biomateriais *in vivo* pode originar respostas adversas por parte do corpo humano como infeções bacterianas, devido à adesão e colonização de bactérias à superfície dos materiais. Assim sendo, este estudo teve como objetivo analisar se os filmes têm carácter antibacteriano, permitindo ou não a formação de colónias de bactérias.

No procedimento experimental, recorreu-se à estirpe *S. aureus*, uma das bactérias mais comumente responsáveis por essas infeções, cultivadas num meio LB contendo rezasurina (Morgado, 2015; Alves, et al., 2014). As bactérias têm a capacidade de metabolizar a rezasurina produzindo a resofurina, um composto fluorescente. Assim, para determinar as bactérias presentes no meio recorreu-se a um espectrofluorímetro, numa gama de comprimentos de onda de cerca 560-590 nm, permitindo quantificar a fluorescência e posteriormente, o número de bactérias viáveis.

Pela Figura 19, pode-se verificar que os filmes não apresentam carácter antibacteriano devido ao facto de, ao fim de 48 horas, permanecerem valores muito elevados de bactérias viáveis existentes à superfície e nas zonas envolventes dos filmes. Um dos parâmetros que influencia diretamente a adesão bacteriana é a energia de superfície (seção 3.2.6). Apesar dos valores de energia de superfície dos filmes preparados não serem elevados, as suas componentes polares são significativas o que promoverá uma interação com as bactérias. Sob outra perspetiva, a rugosidade que se verifica na superfície dos filmes promove também esta mesma adesão (He, Zhang, Lai, & Chan, 2015).

Por outro lado, pode-se concluir que a incorporação da dexametasona nas formulações dos filmes não altera este comportamento relativamente à capacidade antibacteriana. Assim sendo, para a utilização destas membranas na superfície das lesões tópicas, é necessário adicionar um fármaco do tipo antibiótico, na composição dos filmes para aumentar o seu potencial antibacteriano.

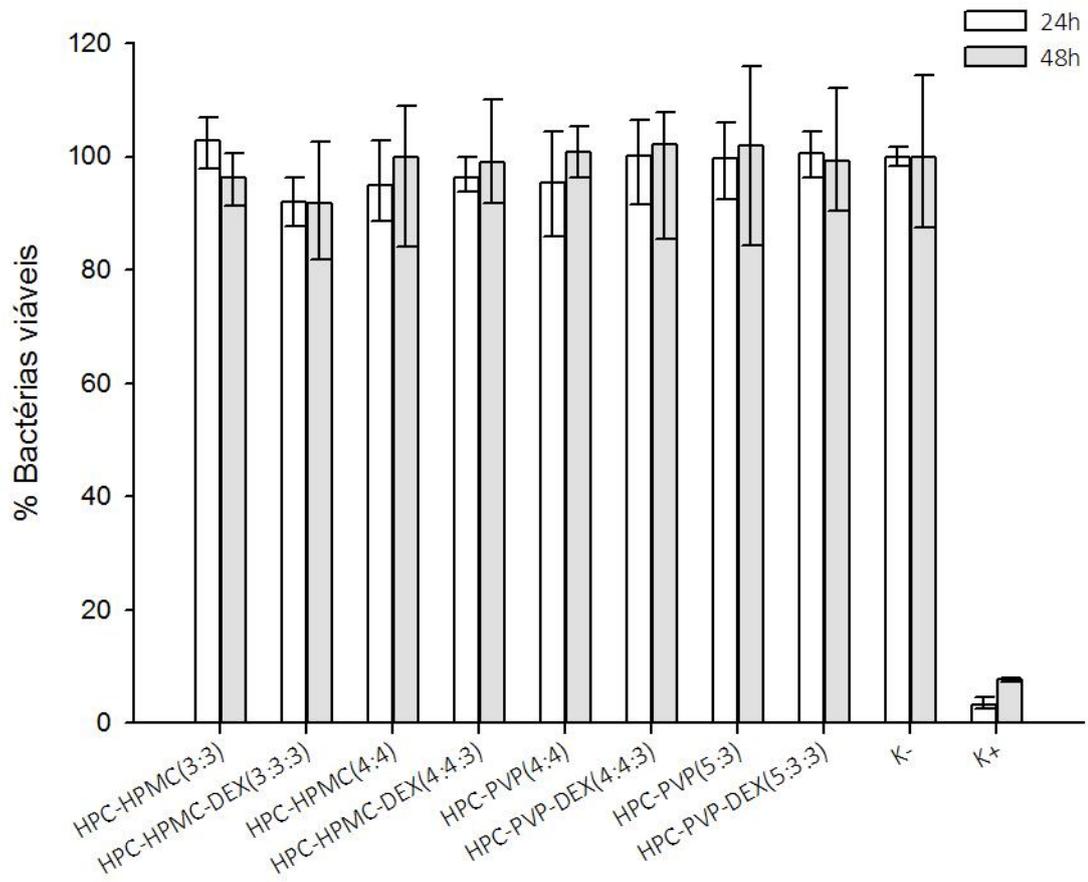


Figura 19. Avaliação da atividade bacteriana durante 48 horas de contacto com os filmes. K⁻, controlo negativo; K⁺, controlo positivo.

3.4. Resumo das propriedades dos sprays

A Tabela 9 apresenta as propriedades adquiridas nos testes de caracterização.

Tabela 9. Resumo das propriedades avaliadas no presente trabalho.

Propriedades	Materiais			
	HPC-HPMC(3:3)	HPC-HPMC(4:4)	HPC-PVP(4:4)	HPC-PVP(5:3)
T _g (°C)	108	111	14	32
Tempo de solubilização (s)	12	21	3	4
Viscosidade (Pa.s)	0,07	0,18	0,05	0,11
Energias de Superfície (mN/m)	23,2 ± 2,2	30,1 ± 2,6	21,8 ± 3,0	26,6 ± 2,0
Formação de coágulos (%)	70,2	66,5	78,1	68,7
Viabilidade celular(%) ^(ao fim de 7 dias)	84,0	87,5	44,8	45,3
Atividade antibacteriana (%) ^(ao fim de 48h)	96,3	99,8	96,1	101,8

4. Conclusão

O trabalho desenvolvido teve como principal foco a investigação de novos materiais com a capacidade de proteger provisoriamente lesões tóxicas. Estes materiais têm como objetivo a sua utilização em situações de emergência onde não é possível o seu tratamento adequado no imediato. Deste modo, desenvolveram-se quatro tipos de sprays à base de soluções copoliméricas com diferentes compostos e concentrações. As soluções poderão ser pulverizadas sobre as áreas afetadas e, após um curto período de tempo, forma-se o filme polimérico à superfície, com base no método de evaporação de solvente.

Os materiais foram sujeitos a diversos testes de caracterização para avaliar o seu potencial para a aplicação em estudo, nomeadamente requisitos como solubilização em soro fisiológico, biocompatibilidade e carácter trombogénico.

O teste de reologia teve como intuito analisar o comportamento de escoamento e de deformação das soluções poliméricas desenvolvidas. Para este estudo selecionou-se a temperatura (37°C) e a taxa de deformação (0,1 a 200 rpm) e avaliou-se a variação da tensão de corte e da viscosidade de cada amostra nestas condições. Dado os resultados obtidos, os perfis demonstram um comportamento semelhante ao dos fluidos newtonianos. Este fenómeno verifica-se devido ao facto da tensão de corte ser diretamente proporcional à taxa de deformação, enquanto a viscosidade se mantém constante, ou seja, é independente à taxa de deformação. As soluções poliméricas apresentam valores de viscosidade entre 0,05 Pa.s e 0,18 Pa.s. Assim sendo, foi possível concluir que as soluções são viáveis sob a forma de spray, de acordo com a gama de valores de viscosidades adquiridos na literatura (0,014 a 0,2 Pa.s).

A análise de DMTA permitiu avaliar as propriedades mecânicas e térmicas dos filmes, quando sujeitos a variações de temperaturas e de multifrequências. O pico em $\tan \delta$ possibilitou a determinação das temperaturas de transição vítrea, que por sua vez permitiu avaliar as propriedades mecânicas de acordo com as temperaturas registadas. Entre todas as amostras, a HPC-HPMC(4:4) exibiu uma maior T_g , cerca de 111°C. Assim sendo, pode-se concluir que este material apresenta maior rigidez e resistência térmica comparativamente com os restantes materiais. Este fenómeno é devido às ligações entre as cadeias e os grupos funcionais presentes nas cadeias principais. O material mais flexível, o HPC-PVP(4:4), exibe uma T_g cerca de 14°C.

Conclui-se que os polímeros HPMC e PVP possuem propriedades muito distintas o que influencia as propriedades térmicas e mecânicas das membranas.

Uma das propriedades mais importantes nos filmes desenvolvidos é a sua capacidade de solubilização em soluções aquosas. Assim sendo, colocaram-se as membranas em contacto direto com a solução de soro fisiológico e cronometrou-se o tempo que os filmes demoraram a solubilizarem-se completamente. Este teste permitiu concluir que todos os filmes são suscetíveis à solubilização em soluções aquosas, mas apresentam tempos distintos. O filme com menor tempo de solubilização (3 minutos) foi o HPC-PVP(4:4) enquanto que o filme com maior valor de tempo (21 minutos) foi o HPC-HPMC(4:4).

Face à aplicação em estudo, os filmes devem apresentar a capacidade de adesão a tecidos biológicos. Deste modo, realizou-se um teste qualitativo no qual se pulverizaram as soluções em tiras de carne de porco e após a secagem dos filmes, averiguou-se o comportamento das membranas sobre a superfície da carne. Este teste permitiu constatar que a adesão entre os filmes e os tecidos biológicos presentes na carne são fortes pois formaram uma camada protetora e, posteriormente, não foi possível retirá-los. Os filmes HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3) exibiram filmes homogêneos com espessura bastante reduzida. Contudo, os materiais HPC-HPMC(3:3) e HPC-HPMC(4:4) formaram filmes do tipo gelatinoso devido à sua capacidade de absorção da água retida na carne.

Para melhor perceber a interação dos filmes com o sangue e a pele, determinaram-se as suas energias de superfície permitindo constatar que apresentam energias de superfície inferiores aos apresentados pelas superfícies aderentes. Concluiu-se que os filmes aderem de forma eficaz aos substratos, bem como as componentes polares são superiores às componentes dispersivas sendo possível confirmar que os materiais são hidrofílicos.

Estudos de hemocompatibilidade foram conduzidos para avaliar o índice hemolítico e o potencial trombogénico dos filmes. No contacto entre o sangue-ACD e os materiais constatou-se que todos os materiais apresentaram um carácter trombogénico, no qual o HPC-HPMC(4:4) apresenta 67% e HPC-PVP(4:4) cerca de 78% de trombos formados. Estes resultados indicam que os materiais poderão contribuir positivamente para estancar hemorragias. Relativamente à determinação de índices hemolíticos não foi possível retirar resultados conclusivos devido às dificuldades encontradas durante o procedimento experimental. Todavia, foi possível verificar qualitativamente que estes não aparentam ter carácter hemolítico, visto que o sobrenadante

exibe uma cor quase transparente, indicando que não existiu destruição das membranas dos glóbulos vermelhos.

Finalmente, para analisar a biocompatibilidade dos materiais realizaram-se dois testes *in vitro*: estudo da viabilidade celular e estudo da atividade antibacteriana. O primeiro teste consistiu no contacto entre os materiais/fibroblastos humanos para compreender se existia a capacidade de promover o crescimento celular à superfície dos filmes. Pelos resultados obtidos, no 7º dia de ensaio, existiu uma diminuição no número de células viáveis no meio. Pode-se constatar que os materiais não interferiram na viabilidade celular às 24 horas, mas inibiram o crescimento celular aos 7 dias de incubação. O material que apresentou maior número de células viáveis ao fim de sete dias foi HPC-HPMC(4:4). Também foi possível verificar que a dexametasona foi também fator que inibiu o crescimento celular, indicando que a sua concentração poderá ser excessiva. O estudo da atividade antibacteriana indicou que os materiais não têm carácter bactericida pois, ao fim de 48h, apresentam valores elevados de bactérias no meio. Assim, conclui-se que os materiais não têm a capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Uma alternativa para contornar este problema será a incorporação de antibióticos nas composições das soluções copolímeras.

Analisando os resultados globalmente, verifica-se a existência de características bastante distintas entre os filmes produzidos. Comparativamente, as membranas HPC-HPMC(3:3) e HPC-HPMC(4:4) apresentam tempos de solubilidade mais prolongados e temperaturas de transição vítrea elevadas. Assim sendo, estas propriedades permitem concluir que os filmes que contêm o polímero HPMC possibilitam a formação de filmes mais densos, com capacidade de absorção de soluções aquosas comportando-se como hidrogéis. Assim, poderá ser benéfico a sua utilização se existir hemorragia no local de aplicação.

Relativamente aos filmes HPC-PVP(4:4) e HPC-PVP(5:3), estes apresentam características distintas. Estas membranas apresentam elevada solubilização em soluções aquosas e baixos valores de temperaturas de transição vítrea, facilitando a sua remoção sobre as lesões sem danificar os tecidos.

Face a todos os resultados, conclui-se que os sprays desenvolvidos têm a capacidade de satisfazer os critérios estabelecidos para a aplicação ambicionada, podendo ter um papel fundamental na área da medicina, bem como no tratamento de lesões em situações de emergência.

5. Perspetivas Futuras

Na presença dos resultados obtidos na realização dos testes de caracterização foi possível obter novas ideias e um conjunto de linhas de trabalho para melhorar e solucionar alguns problemas identificados ao longo do trabalho. De seguida, apresentam-se algumas estratégias de investigação pretendidas para o futuro.

Para a aplicação em estudo, as formulações pulverizadas à superfície da pele devem ter a capacidade de formar filmes rapidamente. Assim sendo, para otimizar o tempo de secagem dos filmes deve-se incorporar um agente de secagem para auxiliar na formação dos filmes em poucos segundos.

Por outro lado, pode-se estudar a incorporação de anestésicos nas formulações para melhorar o conforto do paciente, inibindo as dores instantaneamente após a sua aplicação. Por outro lado, para inibição do crescimento de bactérias na superfície dos filmes e na área envolvente também será necessário incorporar antibióticos para garantir o potencial bactericida dos materiais.

A repetição dos testes de hemocompatibilidade *in vitro* é fundamental para assegurar os resultados obtidos, principalmente a avaliação do índice hemolítico devido aos problemas associados na quantificação da percentagem de hemólise no contacto dos materiais com o sangue. De outro modo, poderá ser vantajoso repetir os testes de biocompatibilidade *in vitro*. Contudo, deve-se reduzir o tempo de ensaio para 2-3 horas, uma vez que estes materiais são apenas utilizados provisoriamente logo, será interessante perceber o seu comportamento apenas nas primeiras horas de contacto.

Será necessário a realização do teste de adesão a tecidos *in vivo* para avaliar a interação existente entre os materiais e os diversos tecidos e componentes presentes à superfície da pele de forma mais eficiente. Conjuntamente, também será necessário realizar testes de biocompatibilidade *in vivo* para avaliar a ocorrência de reações alérgicas, tóxicas e inflamatórias que possam induzir.

A humidade é uma das condições das quais os filmes poliméricos são expostos quando aplicados nas áreas afetadas. Assim, revelou-se interessante avaliar o comportamento dos materiais num ambiente com humidade controlada. Por outro lado, outro fator importante para as membranas é a permeabilidade ao oxigénio, permitindo manter um microambiente

propício para a cicatrização da pele. Portanto, será necessário perceber se os filmes são permeáveis e se permitem trocas gasosas entre os meios (meio ambiente e interno).

6. Referências Bibliográficas

- 3M. (2014). 3M Petcare Liquid Bandage. Obtido em 3 de Setembro de 2016, de goo.gl/KtXLHU
- Alves, P., Cardoso, R., Correia, T. R., Antunes, B. P., Correia, I. J., & Ferreira, P. (2014). Surface modification of polyurethane films by plasma and ultravioletlight to improve haemocompatibility of artificial heart valves. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 25-32.
- Ashland Specialty Ingredients. (2014). Klucel: Hydroxypropylcellulose. *Physical and chemical properties*. Obtido em 14 de Julho de 2016, de <http://goo.gl/nZS5ib>
- ASTM F 756-00. (2000). *Standard Practices for Assessment of Haemolytic Properties of Materials*.
- ati. Nursing Education. (2008). *Wound Care - Dressing and bandage types*. Obtido em 21 de Junho de 2016, de ati. Nursing Education: goo.gl/g0NhXB
- Berg, J. C. (2009). *An Introduction to Interfaces & Colloids: The Bridge to Nanoscience* (Vol. 8).
- Betadine®. (2014). *Betadine® Spray*. Obtido em 2 de Julho de 2016, de <http://goo.gl/AxulM9>
- Beugeling, T. (1979). The Interaction of Polymer Surfaces with Blood. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposium*, 66, 419-428.
- Braune, S., Grunze, M., Straub, A., & Jung, F. (2013). Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials? *Journal for Biophysical Chemistry : Biointerphases*, 8(33), 1-9.
- Brodovsky, S., Dagan, R., & Ben-Bassatt, M. (1986). Nobecutane spray as a temporary dressing of skin graft donor sites. *J. Dermatology Oncol.*, 12(4), 386-388.
- Coates, J. (2006). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. Em R. A. (Ed), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 10815-10837). John Wiley & Sons.
- Coltro, M. C. (2014). *Síntese e Caracterização de polímeros biodegradáveis para libertação controlada de dexametasona*. Tese de doutoramento , Universidade Federal de Goiás , Instituto de Química.
- Correia, T. R., Ferreira, P., Vaz, R., Alves, P., Figueiredo, M. M., & Correia, I. J. (2016). Development of UV cross-linked gelatin coated electrospunpoly(caprolactone) fibrous scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Daunton, C., Kothari, S., Smith, L., & Steele, D. (2012). A history of materials and practices for wound. *Wound Practice and Research*, 20(4), 174-186.
- DOW®. (2011). *CARBOWAX™ Polyethylene Glycols*. Obtido em 3 de Julho de 2016, de DOW®: goo.gl/LYhdbA
- D'Souza, A. A., & Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *J. Expert Opinion on Drug Delivery*, 1-19.

- Eastman Chemical Company. (2013). Butvar®. *Polyvinyl Butyral Resin: Properties and uses*, (pp. 1-29). Obtido em 6 de Julho de 2016, de <http://goo.gl/tQCeWD>
- Elastoplast®. (2009). *First Aid Spray Plaster*. Obtido em 22 de Junho de 2016, de [Elastoplast: goo.gl/6Kous7](http://goo.gl/6Kous7)
- Eller, A. G. (1955). Nobecutane as a wound dressing. *The Lancet Public Health*, 265(6856), 200.
- EuroMed. (2014). *Hydrocolloid Technology*. Obtido em 18 de Junho de 2016, de EuroMed: A Scapa Healthcare Company: <http://goo.gl/GmOlyC>
- Ferreira, P. (2007). *Preparação e caracterização de adesivos de base uretana*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- He, T., Zhang, Y., Lai, A. C., & Chan, V. (2015). Engineering bio-adhesive functions in an antimicrobial polymer multilayer. *Biomedical Materials*, 10(1), 015015.
- Hebel, S. K., & Flynn, M. (1997). *In Drug Facts and Comparisons*.
- Heenan, A. (1998). *Alginate Dressings*. Obtido em 20 de Junho de 2016, de World Wide Wounds: goo.gl/2D4Bf3
- Huichao, W., Shouying, D., Yang, L., Ying, L., & Di, W. (2014). The application of biomedical polymer material hydroxypropylmethylcellulose(HPMC) in pharmaceutical preparations. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 155-160.
- Imai, Y., & Nose, Y. (1972). A New Method for Evaluation of Atithrombogenicity of Materials. *J. Biomed. Mater. Re.*, 6, 165-172.
- Infarmed. (2000). *Hormonas e medicamentos usados no tratamento das doenças endócrinas*. Obtido em 20 de Julho de 2016, de Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos: <https://goo.gl/b0UIFX>
- ISO 10993-4. (1999). *ISO 10993-4:2002*. Obtido em 20 de Julho de 2016, de ISO - International Organization for Standardization: <http://goo.gl/Go9XrU>
- Joshi, S. C. (2011). Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release. *Materials*, 4, 1861-1905.
- Kadajji, V. G., & Betageri, G. V. (2011). *Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications*. Western University of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences.
- Koczur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., & Skrabalak, S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*, 44(41), 17883-17905.
- Kuraray Group. (2014). Polyvinyl Butyral of Superior Quality. *Production of Polyvinyl Butyral*, (pp. 1-43). Obtido em 6 de Julho de 2016, de <http://goo.gl/JcRjBk>
- Mafi, R., Mirabedini, S. M., Attar, M. M., & Moradian, S. (2005). Cure characterization of epoxy and polyester clear powder coatings using Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Dynamic Mechanical Thermal Analysis (DMTA). *Progress in Organic Coatings*, 54, 164-169.

- Marques, D. S., Santos, J. M., Correia, T. R., Ferreira, P., Correia, I. J., Gil, M. H., & Baptista, C. S. (2015). Photocurable bioadhesive based on lactic acid. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 601-609.
- Morgado, S. (2015). *Preparação de adesivos cirúrgicos com ação farmacológica*. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Morgan, N. (2014). *What you need to know about hydrogel dressings*. Obtido em 17 de Junho de 2016, de WoundCare Advisor: <http://goo.gl/VafPnG>
- Neto, M., & Rodrigues, E. (2015). Em casa ou no lazer o acidente pode acontecer. *Acidentes domésticos e de Lazer*, nº1.
- NETZSCH. (2015). *Dynamic Mechanical Thermal Analysis (DMTA)*. Obtido em 2 de Agosto de 2016, de NETZSCH: <https://goo.gl/SpSzU6>
- NIPPON SHOKUBAI. (2001). *PVP: Poly vinyl pyrrolidone*. Obtido em 2 de Julho de 2016, de NIPPON SHOKUBAI : Performance Chemicals Business: goo.gl/aXCDeL
- Nunes, B. (2008). *Funcionalização de superfícies de silício por radiação laser e implantação iónica: Estudo da molhabilidade*. Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa.
- Osborne, D. W., & Mumper, R. J. (2002). *US Patente Nº 6,432,415*.
- Paar, A. (2016). *Dynamic-Mechanical Thermal Analysis (DMTA)*. Obtido em 2 de Agosto de 2016, de Anton Paar: <http://goo.gl/bZqIFg>
- Posavec, D., Dorsch, A., Bogner, U., Bernhardt, G., & Nagl, S. (2011). Polyvinyl butyral nanobeads: preparation, characterization, biocompatibility and cancer cell uptake. *Microchimica Acta*, 173(3), 391-399.
- Queirós, P., Santos, E., Apóstolo, J. A., & Rodrigues, M. A. (2013). The effectiveness of cleansing solutions for wound treatment: a systematic review. *JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports*, 11(5), 169-181.
- Ribeiro, M. P., Morgado, P. I., Miguel, S. P., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2013). Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 33, 2958-2966.
- Říhová, B. (1996). Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21(2), 157-176.
- Royal Society of Chemistry. (2015). *Dexamethasone*. Obtido em 20 de Julho de 2016, de ChemSpider: <http://goo.gl/wo6WEW>
- Sant'ana, F. (2013). *Avaliação da hemocompatibilidade in vitro de partículas magnéticas de derivados da quitosana*. Tese de Mestrado, Universidade do Vale do Itajaí.
- Santos, F. (2012). *Efeito do escorregamento dos fluidos nas superfícies de medição do reómetro sobre a viscosidade*. Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança.

- Santos, J. (2014). *Preparação de Bioadesivos a partir de Ácido Lático*. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Santos, J. C., Marques, D. S., Alves, P., Correia, T. R., Correia, I. J., Baptista, C. G., & Ferreira, P. (2015). Synthesis, functionalization and characterization of UV-curable lactic acid based oligomers to be used as surgical adhesives. *Reactive and Functional Polymers*, 94, 43-54.
- Santos, R. (2010). *Síntese de materiais poliméricos para regeneração de tecido muscular*. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Sarabahi, S. (2012). Recent advances in topical wound care. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(2), 379-387.
- Sarode, A., Wang, P., Cote, C., & Worthen, D. R. (2013). Low-Viscosity Hydroxypropylcellulose (HPC) Grades SL and SSL: Versatile Pharmaceutical Polymers for Dissolution Enhancement, Controlled Release, and Pharmaceutical Processing. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 151-159.
- Sezer, A. D., & Cevher, E. (2011). Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies. Em R. Pignatello, *Biomaterials Applications for Nanomedicine* (Vol. 19, pp. 383-414). INTECH.
- SIGMA-ALDRICH. (2002). *(Hydroxypropyl)methyl cellulose*. Obtido em 6 de Julho de 2016, de SIGMA-ALDRICH: goo.gl/boKTju
- Sinclair Research. (2015). *Biocompatibility Test Services - In-Vitro Testing*. Obtido em 20 de Julho de 2016, de Sinclair Research: <http://goo.gl/9iEQLJ>
- Snyder, L. (2008). *Wound basics: Types, treatment and care*. Obtido em 14 de Maio de 2016, de Modern Medicine Network: <http://goo.gl/26jOKY>
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. (D. J. Ando, Ed.) John Wiley & Sons.
- Thanedar, N. (2014). *Hydroxypropylmethylcellulose*. Obtido em 6 de Julho de 2016, de Labdoor Magazine: goo.gl/JueJuk
- Tissue, A. (2013). *Your Guide to Hydrocolloid Dressings*. Obtido em 17 de Junho de 2016, de Advanced Tissue: <http://goo.gl/bbb2ky>
- Tissue, A. (2014a). *When and How to Use Hydrogel for Wound Care*. Obtido em 16 de Junho de 2016, de Advanced Tissue: <http://goo.gl/QIWGka>
- Tissue, A. (2014b). *Your Guide to Foam Dressings*. Obtido em 16 de Junho de 2016, de Advanced Tissue: <http://goo.gl/ko95Ow>
- Tissue, A. (2015). *Treating Wounds with Absorbent Alginate Dressings*. Obtido em 14 de Junho de 2016, de Advanced Tissue: <http://goo.gl/td98Ce>
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29, 2941-2953.

- Yeh, J.-T., Chen, C.-L., Huang, K. S., Nien, Y. H., Chen, J. L., & Huang, P. Z. (2006). Synthesis, characterization, and application of PVP/chitosan blended polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, *101*(2), 885-891.
- Yuan, Y., & Lee, T. R. (2013). Contact Angle and Wetting Properties. Em *Surface Science Techniques* (pp. 3-34). Springer.

Anexos

Anexo A. Curativos Tradicionais

Tabela A.1. Curativos tradicionais existentes no mercado.

Produto	Material de Curativo
Bactigras® (Smith & Nephew)	Gaze impregnada com parafina contendo 0,5% de acetato de clorexidina
Jelonet® (Smith & Nephew)	Gaze impregnada com parafina
Xeroform® (Chesegrough-Pond's Inc.)	Gaze impregnada com vaselina de petróleo contendo 3% tribromofenato de bismuto
2nd Skin® (Spenco)	Curativo de hidrogel esterilizado
Gamgee® pad (3M)	Curativo altamente absorvente de algodão
Exu Dry Dressing (Smith & Nephew)	Curativo de duplas camadas: fibras de celulose absorvente/polietileno
Telfa Ouchless (Kendall Covidien)	Curativo absorvente de algodão

Referências citadas neste anexo:

Sarabahi, S. (2012). Recent advances in topical wound care. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(2), 379-387.

Anexo B. Curativos à base de materiais artificiais para o tratamento de ferimentos e queimaduras

Tabela B.1. Curativos artificiais no mercado internacional.

Tipo de Curativo	Produto	Material de curativo
Filmes/membranas	Omiderm® (Omicron Scientific)	Poliuretano
	Opsite® (Smith & Nephew)	
	Bioclusive® (Johnson & Johnson)	
	Tegaderm® (3M)	
	Strech Neal® (Colgate)	Policloreto de vinilo
	Capran77C® (Allied Chemical)	Nylon
	Granuflex® (ConvaTec)	Hidrocoloide de poliuretano
	Aluderm® (Sohngen)	Fibras sintéticas + alumínio
	Scanpore tape® (Norgeplaster)	Fibras sintéticas +metal
	Saran Wrap® (Asaki Kasei)	Cloreto de polivinilideno
Espumas	Carbopad® (Charcoal)	Carvão ativado
	Ivalon® (Chardack)	Polivinil álcool
	Lyof foam® (Ultra Labs)	Poliuretano
Géis	Silastic® (ConvaTec)	Poli(dimetilsiloxano)
	Kaltostat® (ConvaTec)	Alginato de Cálcio
Compósitos	Omiderm® (Omicron Scientific)	Poliuretano com exerto acrilamida e hidroxietilmetacrilato
	Epigard® (Parke-Davis)	Filme de polipropileno e espumas de poliuretano
Sprays	Biobrane® (Smith & Nephew)	Filme de silicone e nylon
	Nobecutane® (Astra Zeneca)	Methacrylic acid ethoxyethyl ester
	Hydron® (Hydron Lab.)	Polihidroxietilmetacrilato e polietileno glicol 400

Referências citadas neste anexo:

Sarabahi, S. (2012). Recent advances in topical wound care. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(2), 379-387.

Anexo C. Propriedade dos reagentes utilizados

Tabela C.1. Lista de reagentes utilizados, respetiva fórmula química, peso molecular e massa volúmica.

Nome da substância	Fórmula Química	Peso molecular (g/mol)	Massa volúmica (g/mL)
Polivinil butiral	$(C_8H_{14}O_2)_n$	50,000	1,083
Polivinil pirrolidona	$(C_6H_9NO)_n$	10,000	1,062
Hidroxipropilcelulose	$(C_{36}H_{70}O_{19})_n$	100,000	ND
Hidroxipropilmetilcelulose	$(C_{56}H_{108}O_{30})_n$	10,000	ND
Polietileno glicol	$H(OCH_2CH_2)_nOH$	400	1,131
Etanol	C_2H_6O	46,06 ^(a)	0,789 ^(a)
Cloreto de sódio	NaCl	58,44 ^(a)	2,165 ^(a)
Clorofórmio	$CHCl_3$	119,38 ^(a)	1,48 ^(a)
Formamida	CH_3NO	45,04 ^(a)	1,134 ^(a)
Etilenoglicol	$C_2H_4(OH)_2$	62,07 ^(a)	ND
Formaldeído	CH_2O	30,03 ^(a)	1,09 ^(a)
Dexametasona	$C_{22}H_{29}FO_5$	392,46	1,30 ^(a)

(a) Dados disponibilizados pelo fornecedor

ND – Não disponível

Anexo D. Avaliação qualitativa das formulações desenvolvidas

Polímero Base	2º Polímero	Plastificante	Composição (polímero1/polímero2/plastificante)	Formação do filme	Características físicas	Solubilidade
PVB	-	-	5:0	✓	Filme muito rígido, quebradiço. Filme transparente	Insolúvel em água
PVB	-	PEG	5:1	✓	PEG torna o filme mais flexível, mais maleável. Filme transparente	Insolúvel em água
PVP	PVB	-	10:1	×	Não é possível destacar o filme. É possível riscar	Mais ou menos solúvel em água
PVP	PVB	PEG	10:1:1	×	Não é possível destacar o filme. Não homogéneo.	Mais ou menos solúvel em água
PVP	PVB	-	10:4	×	Não é possível destacar o filme, filme muito rígido.	Difícil de dissolver em água (devido à elevada % de PVB)
PVP	PVB	PEG	10:4:1	×	Filme bastante aderente ao vidro, semelhante a cola.	Difícil de dissolver (devido à elevada % de PVB)
PVP	HPC	-	10:1	×	Não é possível destacar o filme, filme rígido	Solúvel em água, forma um gel
PVP	HPC	PEG	10:1:1	×	Não é possível destacar o filme, transparente, semelhante a cola	Solúvel em água, forma um gel
PVP	HPC	-	10:4	×	Não é possível destacar o filme, filme rígido	Solúvel em água, forma um gel
PVP	HPC	PEG	10:4:1	×	Não é possível destacar o filme, transparente, mais rígido que o 10:1:1	Solúvel em água, forma um gel

HPC	PVB	-	5:1	×	Não é possível destacar o filme mas possível riscar	Solúvel em água
HPC	PVB	PEG	5:1:1	×	Não é possível destacar o filme mas possível riscar	Solúvel em água
HPC	PVB	-	5:4	×	Não é possível destacar o filme mas possível riscar. Não homogéneo	Difícil de dissolver (devido à elevada % de PVB)
HPC	PVB	PEG	5:4:1	×	Aderente à superfície do vidro (cola)	Difícil de dissolver (devido à elevada % de PVB)
HPC	PVP	-	5:1	×	Não é possível destacar o filme, rígido	Solúvel em água, forma um gel
HPC	PVP	PEG	5:1:1	×	Não é possível destacar o filme, semelhante a cola	Solúvel em água, forma um gel
HPC	PVP	-	5:4	×	Não é possível destacar o filme, rígido	Solúvel em água, forma um gel
HPC	PVP	PEG	5:4:1	×	Não é possível destacar o filme, semelhante a cola	Solúvel em água, forma um gel
HPMC	PVB	-	5:1	✓	Filme flexível, não homogéneo	Solúvel em água
HPMC	PVB	PEG	5:1:1	✓	Filme opaco e flexível	Solúvel em água, desfaz-se facilmente
HPMC	PVB	-	5:4	✓	Filme transparente	Insolúvel em água
HPMC	PVB	PEG	5:4:1	✓	Filme opaco, homogéneo e flexível	Insolúvel em água
HPMC	PVP	-	5:1	✓	Filme flexível, praticamente transparente	Solúvel em água
HPMC	PVP	PEG	5:1:1	✓	Filme mais flexível que o anterior, melhores propriedades	Solúvel em água

Preparação de sprays poliméricos para o tratamento de lesões tópicas

HPMC	PVP	-	5:4	×	Não é possível destacar o filme, rígido, não transparente	Solúvel em água
HPMC	PVP	PEG	5:4:1	✓	Filme rígido, não homogéneo	Solúvel em água, forma um gel
HPMC	HPC	-	5:1	✓	Filme rígido, não homogéneo, pouco flexível	Solúvel mas difícil de dissolver em água
HPMC	HPC	PEG	5:1:1	✓	Filme transparente e homogéneo, boas propriedades. Muito boa flexibilidade	Solúvel em água
HPMC	HPC	-	5:4	✓	Muito difícil de destacar, filme não homogéneo, mais ou menos opaco	Solúvel mas difícil de dissolver em água
HPMC	HPC	PEG	5:4:1	✓	Filme flexível, não homogéneo, mais ou menos opaco	Solúvel mas difícil de dissolver em água

Anexo E. Regiões de absorção da radiação de infravermelhos em polímeros

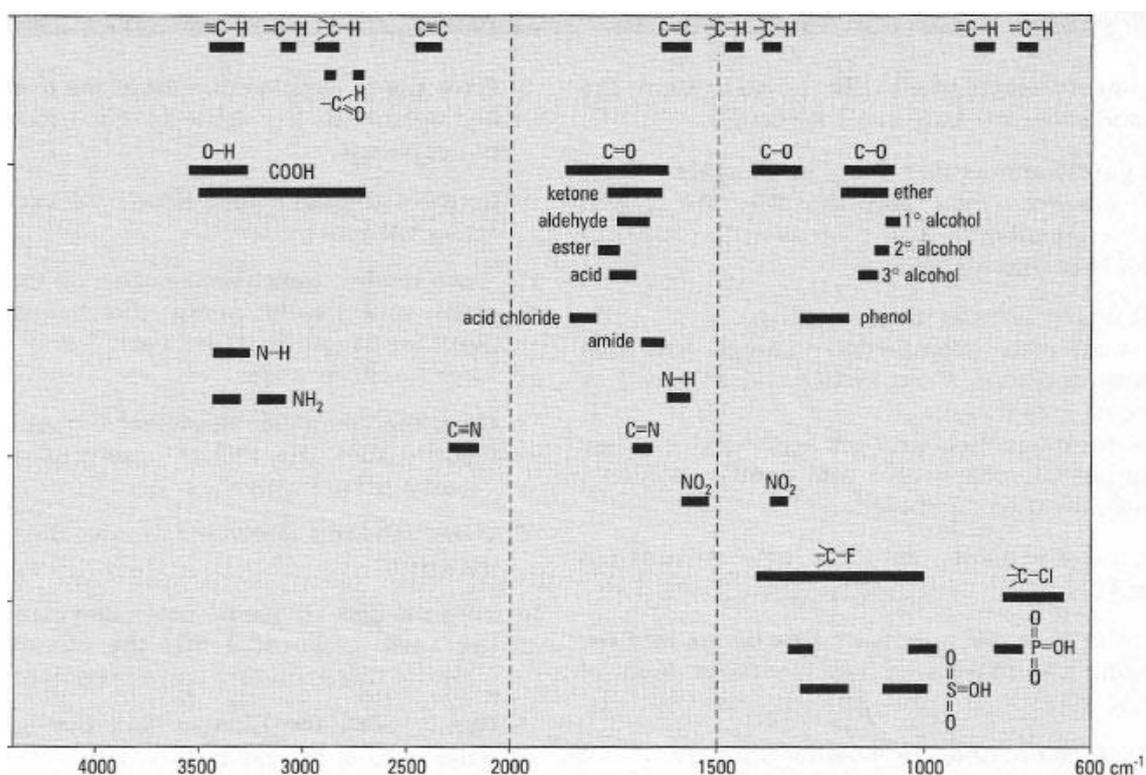


Figura D.1. Bandas de absorção de infravermelhos em polímeros, de acordo com o comprimento de onda e frequência.

Referências citadas neste anexo:

Biocyclopedia. (2012). *Infrared spectroscopy*. Obtido em 6 de Julho de 2016, de Biocyclopedia: goo.gl/id5jun