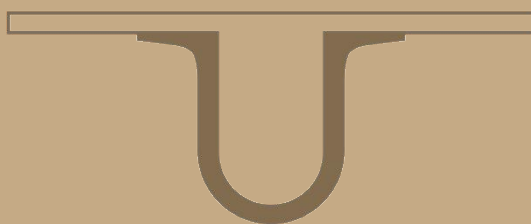




UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Ana Catarina Moreira Antunes

**PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA PENSOS
CURATIVOS**

**Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química,
especialização em Biosistemas orientada pela Professora Doutora
Maria Helena Mendes Gil e pelo Doutor António Jorge Rebelo Ferreira
Guiomar e apresentada ao Departamento de Engenharia Química,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2018

Ana Catarina Moreira Antunes

Preparação de hidrogéis para pensos curativos

Tese de Mestrado na área científica de Engenharia Química, orientada pela Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil e pelo Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Orientadores:

Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil
Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar

Instituição:

Departamento de Engenharia Química
Departamento de Ciências da Vida
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra

2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Financiamento:

FCT Fundação
para a Ciência
e a Tecnologia

*“A nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar
mais uma vez.”
Thomas Edison*

Para a minha mãe...

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com importantes e grandes apoios e incentivos, sem os quais não seria possível concretizar esta tese de dissertação e aos quais estarei eternamente grata. Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto PTDC/CTM-BIO/3640/2014 – “Stereostrat - *Sterilization of clinically active hydrogels: looking for efficient strategies*”, e financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P, a quem desde já agradeço.

Em primeiro lugar quero expressar os meus sinceros agradecimentos aos professores e orientadores, Doutora Maria Helena Gil e Doutor António Jorge Guiomar, por me deixarem fazer parte deste projeto, pela orientação dada, pelos conhecimentos transmitidos e pela prontidão em ajudar a solucionar problemas e dúvidas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

Um enorme e especial obrigado à Filipa Martins que esteve sempre disponível para me orientar no laboratório, tirar dúvidas pontuais e partilhar a sua experiência na temática deste trabalho.

Às minhas amigas Sofia Portugal e Diana Pinheiro pela amizade, companheirismo, força e todo o apoio nos momentos mais difíceis. Às minhas companheiras de trabalho, Denise Costa e Vanessa Almeida, com quem passei grande parte do tempo que estive no laboratório, pela ajuda e apoio em alguns momentos críticos.

A todos os meus amigos e colegas, pela coragem, pelos cafés e risadas que me fizeram ganhar forças para terminar este projeto. Em particular ao Davide pela paciência infinita, por todas as palavras de encorajamento, pelo apoio incondicional e por me fazer acreditar que seria capaz.

A toda a minha família, de sangue e de coração, por todos os ensinamentos, pela força e presença constante neste percurso.

E, por último, mas mais importante, à minha Mãe que lutou muito para eu poder chegar até aqui, por todo o amor, apoio incansável e palavras sábias, que fazem de mim o que sou hoje.

A todos, o meu sincero Obrigado!

Ana Catarina Antunes

Resumo

A eficácia dos sistemas de libertação controlada de fármacos depende da concentração libertada no local a tratar durante um período de tempo adequado. Nos dias de hoje, já existem alguns produtos disponíveis no mercado que permitem facilitar o tratamento de feridas, minimizando o risco de infeções e acelerando o processo de cicatrização. No entanto, a limpeza e desinfeção das feridas tem de ser feita várias vezes ao dia, com mudas frequentes de pensos, o que pode interferir no processo de cicatrização de feridas. O uso de pensos curativos com sistemas de libertação de fármacos é uma possível solução, devido ao contacto prolongado com o leito da ferida e ao elevado grau de conforto evitando as mudas frequentes de penso.

Ao longo deste trabalho foram desenvolvidos alguns filmes de hidrogel para poderem ser usados como sistema de libertação controlada de um agente antisséptico (poli(hexametileno biguanida), PHMB), partindo do quitosano, através do método de evaporação do solvente. Apenas um dos filmes obtidos foi selecionado para caracterização e para os estudos de libertação de PHMB: o filme à base de quitosano também, contém ácido succínico, 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-*p*-toluenossulfonato (CMC; reticulante) e glicerol (plastificante).

Foi analisada a capacidade de inchaço do filme selecionado (141%), os espectros vibracionais no infravermelho, a curva de termogravimetria e as imagens de SEM. Os resultados revelaram uma capacidade de inchaço de 141%, superior à de produtos comerciais, como por exemplo, XCell® (~71%). O filme é facilmente dobrado e manuseado sem que se quebre, apresenta fortes propriedades de adesão e revelou uma rápida capacidade de absorção de água.

A PHMB foi imobilizada/ carregada por imersão no filme selecionado como o mais promissor. Os resultados do estudo de libertação controlada de PHMB foram realizados sob condições *sink*, em três ensaios. Um dos ensaios destaca-se dos outros porque o processo de lavagem das amostras utilizadas foi diferente. O Ensaio 1 foi aquele que apresentou absorvâncias no branco mais elevadas, o que significa que a lavagem não foi eficaz. Assim, foi realizado um processo de lavagem mais vigoroso nos Ensaios 2 e 3. Nestes dois ensaios, as condições de lavagem e do estudo de libertação foram as mesmas para ambos, e confirmaram a reprodutibilidade dos ensaios. Os ensaios de libertação foram realizados durante 3 dias, porém as amostras libertaram PHMB durante ~0,5 dias para os Ensaios 2 e 3 e ~1 dia para o Ensaio 1, sendo a maior quantidade de PHMB libertada nas primeiras 8 h e o equilíbrio atingido quando ~33 - 34 µg de PHMB/mg de disco seco foram libertadas. A concentração de PHMB libertada

encontra-se acima dos valores da $MIC_{24\text{ h}}$ ($2\ \mu\text{g/mL}$) $\sim 10 - 11$ h após começar o ensaio de liberação para os três ensaios realizados. O modelo cinético que melhor se adequou ao perfil de liberação foi o modelo de Korsmeyer-Peppas, o tipo de transporte característico é a difusão Fickiana e o coeficiente difusional de $25 \times 10^{-3}\ \text{mm}^2/\text{d}$. Assim sendo, o filme FBQ 1 é adequado para aplicação em pensos curativos.

Palavras-chave: Hidrogel; Quitosano; Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos; Poli(hexametileno biguanida); Pensos curativos.

Abstract

The efficacy of controlled drug delivery systems depends on the concentration released at the site to be treated for a suitable period of time. Nowadays, there are already some products available in the market that facilitate wound treatment, minimizing the risk of infections and accelerating the healing process. However, wound cleaning and disinfection has to be done several times a day, with frequent dressing changes, which can interfere with the wound healing process. The use of wound dressings with drug delivery systems is a possible solution, due to prolonged contact with the wound bed and to the high degree of comfort avoiding frequent dressing changes.

Throughout this work, some hydrogel films have been developed to be used as a controlled delivery system of an antiseptic agent (poly(hexamethylene biguanide), PHMB), starting from chitosan, by the solvent evaporation method. Only one of the obtained films was selected for characterization and for the PHMB release studies: the chitosan-based film also, contains succinic acid, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide met-p-toluenesulfonate (CMC; crosslinker) and glycerol (plasticizer).

The swelling capacity of the selected film (141%), the infrared vibrational spectra, the thermogravimetry curve and the SEM images were analyzed. The results showed a swelling capacity of 141%, higher than commercial products, for example XCell[®] (~71%). The film is easily folded and handled without breaking, has strong adhesion properties and has revealed a rapid water absorption capacity.

The PHMB was immobilized/loaded by immersion in the film selected as the most promising. The results of the PHMB controlled release study were performed under *sink* conditions in three trials. One of the trials highlights from the others because the washing process of the samples used was different. Trial 1 was the one with the highest white absorbencies, which means that the wash was not effective. Thus, a more vigorous washing process was performed in trials 2 and 3. In these two trials, the washing and release study conditions were the same for both, and confirmed the reproducibility of the assays. The release assays were performed for 3 days, however the samples released PHMB for ~0,5 days for trials 2 and 3 and ~1 day for trial 1, the highest amount of PHMB being released in the first 8 h and the equilibrium reached when ~33 – 34 µg of PHMB/mg of dry disk were released. The concentration of released PHMB is above MIC_{24h} (2 µg/mL) ~10 – 11 h after starting the release assay for the three trials performed. The kinetic model that best suited the release profile was the Korsmeyer-Peppas model, the type of characteristic transport is Fickian diffusion and the

diffusional coefficient of $25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{d}$. Therefore, the FBQ 1 film is suitable for application to wound dressings.

Key-words: Hydrogel; Chitosan; Controlled drug delivery systems; Poly(hexamethylene biguanide); Wound dressings.

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Índice geral.....	vii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
Motivação e objetivos	1
CAPÍTULO 1 – Introdução.....	3
1.1 Feridas	3
1.2 Sistemas de libertação controlada de fármacos.....	5
1.3 Hidrogéis	6
1.4 Filmes à base de quitosano.....	10
1.4.1 Quitosano	10
1.4.2 Plastificantes	11
1.4.3 Agentes reticulantes	12
1.5 Fármaco: PHMB	14
1.5.1 Imobilização do fármaco.....	16
1.6 Análise da cinética de libertação do fármaco.....	17
1.7 Estado de arte	21
1.8 Técnicas de caracterização.....	26
1.8.1 Capacidade de inchaço	28
1.8.2 Espectroscopia vibracional de infravermelho	28
1.8.3 Termogravimetria.....	29
1.8.4 Microscopia eletrónica de varrimento.....	29
1.8.5 Goniometria de ângulos de contacto	30

CAPÍTULO 2 – Materiais e Métodos	31
2.1 Materiais.....	31
2.2 Métodos.....	32
2.2.1 Preparação dos filmes à base de quitosano	32
2.2.2 Carregamento do fármaco	34
2.2.3 Quantificação do fármaco carregado	34
2.2.4 Estudos de libertação do fármaco	35
2.3 Caracterização do filme	36
2.3.1 Capacidade de inchaço	36
2.3.2 Espectroscopia de Infravermelhos	36
2.3.3 Termogravimetria.....	36
2.3.4 Microscopia eletrónica de varrimento.....	37
2.3.5 Goniometria de ângulos de contacto	37
CAPÍTULO 3 – Resultados e Discussão	38
3.1 Preparação dos filmes à base de quitosano	38
3.2 Seleção da formulação	42
3.3 Caracterização do filme selecionado	43
3.3.1 Capacidade de inchaço	43
3.3.2 Espectroscopia de Infravermelhos	44
3.3.3 Termogravimetria.....	45
3.3.4 Microscopia eletrónica de varrimento.....	46
3.3.5 Goniometria de ângulo de contacto.....	47
3.4 Cinética de libertação para o sistema de libertação controlada.....	48
3.4.1 Quantificação de fármaco carregado.....	48
3.4.2 Perfil de libertação do fármaco	49
3.4.3 Estudo da cinética de libertação do fármaco.....	55
4 Conclusões e perspectivas futuras	61
Referências.....	63

Anexos	70
Anexo A – Filmes à base de quitosano preparados.....	70
Anexo B – Curva de calibração	73
Anexo C – Frases de Risco e de Segurança dos principais reagentes utilizados	74

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Estágios de cicatrização de feridas: (a) Epiderme intacta; (b) Hemostasia; (c) Inflamação; (d) Migração e proliferação; (e) Maturação/ Remodelação da epiderme (adaptado de Sonnemann e Bement, 2011).	4
Figura 1.2 - Estrutura química de alguns polímeros sintéticos: (a) PEG; (b) PHEMA; (c) PAA; (d) PNIPAAm; (e) PLA; (f) PVP; e (g) PVA.....	8
Figura 1.3 - Estrutura química de alguns polímeros naturais: (a) Quitosano (b) Alginato (em que m representa o ácido β -D-manurónico e n o ácido α -L-gulurónico); (c) Ácido hialurónico; e (d) Pectina.....	9
Figura 1.4 - Estrutura química de (a) Quitina e; (b) Quitosano.	10
Figura 1.5 - Estrutura química de (a) CMC e; (b) Glioxal.....	12
Figura 1.6 - Reticulação do quitosano pelo glioxal. (a) Glioxal reage com os grupos hidroxilo do quitosano; (b) Glioxal reage com os grupos amina do quitosano (adaptado de Yang <i>et al.</i> , 2005).....	13
Figura 1.7 - Reação entre os grupos carboxílicos do ácido carboxílico com os grupos diimina da CMC, resultando no intermediário ativo <i>O</i> -acilisourea.	13
Figura 1.8 - Reação entre o intermediário ativo e o quitosano, resultando a formação de uma ligação amida entre o ácido e o quitosano.	13
Figura 1.9 - Reticulação do quitosano pela CMC na presença de ácido succínico.....	14
Figura 1.10 - Estrutura química da PHMB.	15
Figura 1.11 - Métodos de carregamento de agentes terapêuticos: (a) Permeação; (b) Oclusão; e (c) Ligação covalente (adaptado de Liu <i>et al.</i> , 2018).	17
Figura 1.12 - Ângulo de contacto entre uma superfície sólida e uma gota de líquido...30	
Figura 3.1 - Esquema da formação do PEC entre a pectina e o quitosano (adaptado de Coimbra <i>et al.</i> , 2011).	38
Figura 3.2 - Aspeto visual dos filmes à base de quitosano preparadas em laboratório. 39	
Figura 3.3 - Aspeto visual do filme FBQ 8 após tratamento.	41
Figura 3.4 - Variação da capacidade de inchaço de amostra do filme FBQ 1 até ser atingido o equilíbrio, em função do tempo de imersão numa solução de NaCl (0,9%) a 37 °C ($n = 3$, SD). Inserção: Ampliação das 2 horas iniciais da curva. CS (t) é a capacidade de inchaço no instante t.....	43
Figura 3.5 - Espectro FTIR-ATR do filme FBQ 1.	44

Figura 3.6 - Perfil da perda de massa durante a decomposição térmica de uma amostra de FBQ 1 e quitosano. Linha contínua: curva termogravimétrica de FBQ 1; Linha descontínua: curva termogravimétrica do quitosano em pó.	45
Figura 3.7 - Imagens obtidas por SEM de FBQ 1: (a) e (b) superfície; (c) e (d) secção transversal. (a) e (c) obtidas com uma ampliação de 100x; (b) e (d) obtidas com uma ampliação de 500x. (As partículas que se observam na imagem devem-se à presença de outras amostras, analisadas em simultâneo, na câmara do microscópio).	47
Figura 3.8 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), com as barras de erro (SD; n = 3), para o Ensaio 1 de libertação do filme FBQ 1. Losango azul: curva de discos sem PHMB (branco); quadrado vermelho: curva de libertação não corrigida; triângulo verde: curva de libertação com subtração do branco. ..	50
Figura 3.9 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), com as barras de erro (SD; n = 3), para o Ensaio 2 de libertação do filme FBQ 1. Losango azul: curva de discos sem PHMB (branco); quadrado vermelho: curva de libertação não corrigida; triângulo verde: curva de libertação com subtração do branco. ..	51
Figura 3.10 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), com as barras de erro (SD; n = 3), para o Ensaio 3 de libertação do filme FBQ 1. Losango azul: curva de discos sem PHMB (branco); quadrado vermelho: curva de libertação não corrigida; triângulo verde: curva de libertação com subtração do branco. ..	52
Figura 3.11 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), para os Ensaios 1, 2 e 3 de libertação. Losango azul: curva de libertação corrigida com a subtração do branco para o Ensaio 1; quadrado vermelho: curva de libertação corrigida com a subtração do branco para o Ensaio 2; triângulo verde: curva de libertação corrigida com a subtração do branco para o Ensaio 3. (Nota: o Ensaio 1 não é comparável com os Ensaios 2 e 3 porque o processo de lavagem foi diferente).	53
Figura 3.12 - Concentração de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm) e valor da MIC _{24h} e MIC _{24h} -máxima da literatura. Linha azul escuro: concentração de PHMB libertada com subtração do branco para o Ensaio 1; linha vermelha: concentração de PHMB libertada com subtração do branco para o Ensaio 2; linha verde: concentração de PHMB libertada com subtração do branco para o Ensaio 3; linha roxa: valor de MIC máxima ao fim de 24h (ver secção 1.5); linha azul claro: valor de MIC ao fim de 24h sem considerar VRE (ver secção 1.5).	54
Figura 3.13 - Representação gráfica do ajuste dos modelos cinéticos aos resultados de libertação obtido para FBQ 1 obtidos no Ensaio 1.	56

Figura 3.14 - Representação gráfica do ajuste dos modelos cinéticos aos resultados de libertação obtido para FBQ 1 obtidos no Ensaio 2.....	57
Figura 3.15 - Representação gráfica do ajuste dos modelos cinéticos aos resultados de libertação obtido para FBQ 1 obtidos no Ensaio 3.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1.1- MICs para uma exposição de 24 e 48 h de PHMB em algumas estirpes de microrganismos comuns em feridas (Koburger <i>et al.</i> , 2010).	16
Tabela 1.2 - Expoente difusional e respectivo mecanismo de libertação, para filmes poliméricos (Agrawal e Purwar, 2018; Romero <i>et al.</i> , 2018).....	20
Tabela 1.3 – Principais pensos curativos comerciais nas diversas formas físicas e respectivas características e indicações de uso, existentes no mercado.....	22
Tabela 2.1 - Composição dos filmes à base de quitosano preparadas por evaporação do solvente.....	32
Tabela 2.2 - Composição do fluido pseudo-extracelular (Lin <i>et al.</i> , 2001).	35
Tabela 3.1 - Bandas do FTIR de FBQ 1 com as atribuições.....	45
Tabela 3.2 - Massa de PHMB carregada por massa de disco seco correspondente aos três ensaios de libertação.....	48
Tabela 3.3 - Absorvâncias obtidas após a lavagem dos discos de FBQ 1, para os Ensaios 1, 2 e 3, a 236 nm, para dois discos aleatórios ($n = 2$; SD).	49
Tabela 3.4 - Percentagem de PHMB carregado em relação à PHMB presente na solução de carregamento ($n = 3$; SD).	49
Tabela 3.5 – Duração da libertação ($t_{\text{libertação}}$), quantidade de PHMB libertada quando se atingiu o equilíbrio ($[\text{PHMB}]_{\text{eq}}$) e percentagem de PHMB libertada no equilíbrio relativamente à PHMB carregada (PHMB_libertada), para cada ensaio ($n = 3$; SD).....	53
Tabela 3.6 - Massa dos discos secos antes e depois dos ensaios de libertação ($n = 3$; SD).	55
Tabela 3.7 - Coeficiente de determinação ajustado médio, $R_{\text{ajustado2}}$, obtido para os diferentes modelos de cinética de libertação de PHMB ($n = 3$; SD).....	59
Tabela 3.8 - Valor do parâmetro n (coeficiente difusional) do modelo de Korsmeyer-Peppas e respectivo tipo de mecanismo de difusão para FBQ 1 ($n = 3$; SD).....	59
Tabela 3.9 - Constante de libertação, k , e coeficiente difusional aparente, D_{aparente} , obtidos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas para FBQ 1 ($n = 3$; SD).	60

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido acético
AH	Ácido hialurónico
AIC	Critério de informação <i>Akaike</i>
AL	Ácido láctico
Alg	Alginato de sódio
AS	Ácido succínico
ATR	Refletância total atenuada
CMC	1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto- <i>p</i> -toluenossulfonato
CS	Capacidade de inchaço (<i>swelling</i>)
CSeb	Cloreto de sebacoílo
ECM	Matriz extracelular
EG	Etileno glicol
FBQ	Filme à base de quitosano
FTIR	Espetroscopia de infravermelhos com transformadas de <i>Fourier</i>
GL	Glicerol
HMDA	Hexametilenodiamina
MIC	Concentração inibitória mínima
MIC_{24h}	Concentração inibitória mínima para uma exposição de 24 h
MIC_{48h}	Concentração inibitória mínima para uma exposição de 48 h
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
PAA	Poli(ácido acrílico)
PEC	Complexo polieletrólito
PECF	Fluído pseudoextracelular
PEG	Poli(etileno glicol)
PG	Propileno glicol
PHEMA	Poli(metacrilato de 2-hidroxi-etilo)
PHMB	Poli(hexametileno biguanida)
PLA	Poli(ácido láctico)
PNIPAAm	Poli (<i>N</i> -isopropilacrilamida)
PVA	Poli(álcool vinílico)
PVP	Poli(<i>N</i> -vinilpirrolidona)

PVP-I	Iodopovidona
Q	Quitosano
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
SD	Desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
SLC	Sistema de libertação controlada
TGA	Termogravimetria ou análise termogravimétrica
UV-Vis	Ultravioleta – visível
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina

Motivação e objetivos

Todos os anos milhões de pessoas sofrem de feridas agudas e crônicas, sendo gastos milhões de euros no tratamento. Uma estimativa dos gastos totais da *Medicare* nos Estados Unidos Da América (E.U.A.) no ano de 2014, para todos os tipos de ferimentos (desde feridas com infecções, a feridas cirúrgicas e úlceras de pé diabético) variam entre 28,1 e 96,8 bilhões de dólares (24,67 e 84,97 bilhões de euros) (Nussbaum *et al.*, 2018). Assim, surge a necessidade de desenvolver pensos curativos multifuncionais que: (i) forneçam não só proteção física, bem como ajudem a manter o ambiente húmido ideal da ferida; (ii) durem mais tempo antes de serem renovados; e (iii) permitam uma cicatrização da pele mais rápida com ótimos resultados a nível estrutural e estético (Pachuau, 2015; Cremar *et al.*, 2018).

Nem todas as feridas conseguem cicatrizar da melhor forma. Este problema é agravado quando se trata de feridas crônicas, porque há vários factores externos a afectar o processo de cicatrização, tais como, contaminações, infecções, complicações devido às condições físicas e fisiológicas do paciente, diferentes tipos de úlceras, entre outros. As infecções bacterianas são o principal fator que atrasa o processo de cicatrização, o que resulta da falta de agentes antimicrobianos nos pensos, uma vez que a eficácia antimicrobiana de um penso isoladamente é insuficiente, pelo que é necessário que este inclua outras propriedades que melhorem o processo de cicatrização (Cremer *et al.*, 2018). Consequentemente, o tratamento de feridas crônicas exige um tratamento mais longo e intensivo, sendo necessário o uso de agentes terapêuticos que permitam a recuperação ideal das feridas (Pachuau, 2015). Nos E.U.A. o custo estimado no mercado de tratamento de feridas incorporando esses agentes foi estimado em 7 bilhões de dólares (6,14 bilhões de euros) em 2013, e deverá crescer para 10 bilhões de dólares (8,78 bilhões de euros) em 2020.

Alguns sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos, com o objetivo de distribuir diretamente o fármaco no local da ferida, para uma ação sustentada (lenta e prolongada). Estes SLC promovem a otimização da distribuição do fármaco no organismo, evitando flutuações indesejáveis na sua concentração, o que permite uma melhoria na biodisponibilidade. Os SLC permitem adaptar o perfil farmacocinético (“caminho” percorrido pelo fármaco), a velocidade de libertação do fármaco, o local, a duração da ação do fármaco e a sua estabilidade, diminuindo os efeitos secundários adversos, quando comparado com as vias de administração oral (no trato digestivo). Os SLC são altamente vantajosos no tratamento de feridas crônicas uma vez que excluem a necessidade

de administrar, frequentemente, fármacos sob a forma de dosagem convencional (comprimidos, cápsulas, pomadas, etc), e diminuem o tempo que a ferida está exposta evitando possíveis contaminações (Pachua, 2015).

O objetivo deste trabalho é a criação de um hidrogel contendo o agente antisséptico, poli(hexametileno biguanida) (PHMB), já usado no tratamento de feridas, para ser utilizado como penso curativo no tratamento de feridas. O trabalho focou-se no desenvolvimento de filmes à base de quitosano, devido às excelentes propriedades antimicrobianas do quitosano, preparados por evaporação do solvente. No melhor filme foi incorporada PHMB e foi estudada a cinética da sua libertação. Por fim, foi efetuada uma caracterização físico-química do filme.

Este trabalho está organizado em quatro capítulos distintos. No Capítulo 1 é apresentada a história, características, classificação e principais aplicações dos hidrogéis, mencionando os polímeros que podem ser usados na sua preparação. São descritos os materiais utilizados na preparação dos filmes preparados ao longo do trabalho e respetivas reações químicas. É relatada a anatomia, fisiologia e o processo de cicatrização de feridas, bem como enumerados alguns exemplos de pensos curativos existentes no mercado, utilizados no tratamento de feridas. É discutido o fármaco escolhido, bem como são descritos os métodos de incorporação e abordados os modelos matemáticos que descrevem a cinética de libertação do fármaco. Por fim, são apresentadas as técnicas de caracterização do(s) filme(s). No Capítulo 2 são apresentados os materiais e métodos adotados na preparação e caracterização dos filmes. É feita uma descrição detalhada dos procedimentos experimentais, das técnicas de caracterização e do método de carregamento do(s) filme(s). No Capítulo 3 são apresentados os filmes preparados, escolhido(s) o(s) filme(s) mais promissor(es) para prosseguir com o carregamento, apresentado o perfil de libertação, os resultados da caracterização e a discussão de acordo com a sua aplicação. Para finalizar, no Capítulo 4 resumem-se as principais conclusões do trabalho e algumas sugestões de desenvolvimento futuro do trabalho.

CAPÍTULO 1 – Introdução

1.1 Feridas

Uma ferida é vista como uma descontinuidade do tecido epitelial, das mucosas ou de órgãos, comprometendo a sua estrutura e função anatômica normal. Esta pode ser provocada por danos físicos e térmicos (traumas), por condições médicas (incisões cirúrgicas) ou fisiológicas (infecções) (Boateng *et al.*, 2008).

As feridas podem ser classificadas quanto à causa (cirúrgicas, traumáticas ou ulcerativas), quanto ao conteúdo microbiano (limpas, limpas contaminadas, contaminadas ou infetadas), quanto ao tipo de cicatrização (cicatrização por primeira intenção - perda mínima de tecido, ausência de infecção e edema mínimo; cicatrização por segunda intenção – perda excessiva de tecido, com ou sem infecção; ou cicatrização por terceira intenção – ferida com infecção, que só depois de limpa é suturada) (Tazima *et al.*, 2008), quanto ao grau de abertura (aberta ou fechada), quanto ao tempo de duração (agudas ou crônicas) e quanto ao número de camadas e área da pele afetada (superficial ou de espessura total) (Santos *et al.*, 2011).

A cicatrização de feridas é um processo biológico no qual há regeneração e crescimento de tecido. Este consiste num conjunto de estágios, ilustrados na Figura 1.1, em que vários componentes das células e da matriz extracelular atuam para reestabelecer e substituir o tecido danificado, através de processos bioquímicos e celulares complexos (Boateng *et al.*, 2008; Han e Ceilley, 2017). Este processo é composto pelas seguintes fases: (i) hemostasia e inflamação, (ii) migração, (iii) proliferação e (iv) maturação/remodelação. Durante a hemostasia há constrição dos vasos sanguíneos danificados e ativação imediata da coagulação, formando-se um coágulo de fibrina por ação do fibrinogénio presente no exsudato, parando a hemorragia. Em simultâneo, ocorre a fase inflamatória, em que os microrganismos presentes na ferida são eliminados através de respostas vasculares e celulares. Além disso, o exsudato (sangue isento de células e plaquetas) libertado permite que os fagócitos entrem na ferida, eliminem o tecido necrótico e, por ação enzimática, forma-se uma massa amarelada sobre a ferida. Durante as fases de migração e proliferação, as células epiteliais e os fibroblastos deslocam-se para a área lesionada, para substituir o tecido danificado e/ou perdido. As células epiteliais entram em fase rápida de crescimento, a par dos vasos sanguíneos e linfáticos que proliferam (angiogénese), nutrindo e oxigenando o local da ferida e assim possibilitando a proliferação dessas células. Na fase de maturação/remodelação há remoção das estruturas formadas nos estágios anteriores. A fase de migração termina e a fase de proliferação diminui. A matriz extracelular, ECM, é

remodelada, o tecido granular removido e o epitélio é fortalecido (Boateng *et al.*, 2008; Sonnemann e Bement, 2011; Eming *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2016; Han e Ceilley, 2017).

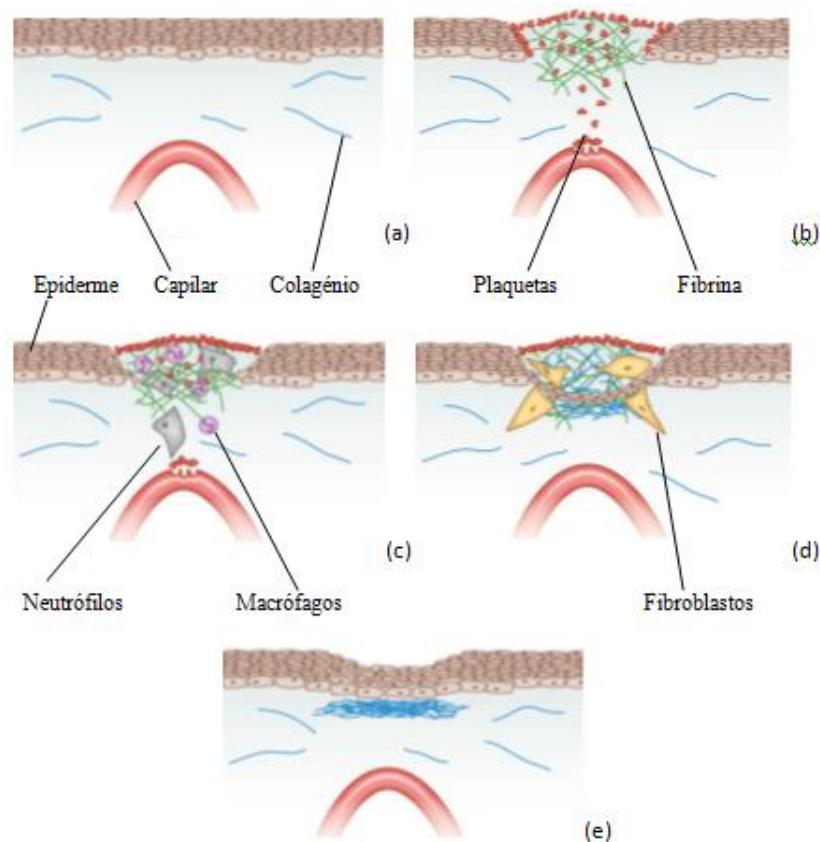


Figura 1.1 - Estágios de cicatrização de feridas: (a) Epiderme intacta; (b) Hemostasia; (c) Inflamação; (d) Migração e proliferação; (e) Maturação/ Remodelação da epiderme (adaptado de Sonnemann e Bement, 2011).

As feridas crônicas resultam de lesões cujo processo de cicatrização é lento e pode ir além das 12 semanas, em que não há a normal regeneração do tecido, por exemplo, com a reposição da integridade anatômica e funcional (Boateng *et al.*, 2008; Ampawong e Aramwit, 2017). Este tipo de feridas permanece no estágio inflamatório por um longo período de tempo, responsável pela libertação de enzimas citotóxicas, radicais livres e mediadores inflamatórios capazes de causar danos no tecido hospedeiro se não forem adequadamente controladas (Finnegan e Percival, 2015; Ampawong e Aramwit, 2017). Assim, é necessário tratar e controlar o exsudato da ferida, bem como remover os corpos estranhos que potenciam complicações durante o seu processo de cicatrização. Em condições fisiológicas normais, o restabelecimento da barreira epidérmica é altamente eficiente (Eming *et al.*, 2014). Contudo, o processo pode ser agravado devido a condições fisiológicas tais como diabetes, infecções persistentes, doenças malignas, mau estado nutricional ou velhice, entre outras circunstâncias relacionadas com o paciente (Boateng *et al.*, 2008). As feridas crônicas podem ser categorizadas em 3 grupos distintos: (i)

feridas de pressão (úlceras do decúbito, escaras); (ii) feridas na parte inferior da perna (úlceras de perna); e, (iii) síndrome do pé diabético (Boateng *et al.*, 2008; Finnegan e Percival, 2015). Assim sendo, é importante desenvolver um tratamento que diminua todas as problemáticas adjacentes a este tipo de feridas.

1.2 Sistemas de liberação controlada de fármacos

Quando um fármaco é administrado oralmente, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo que a outra fração é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e ao metabolismo celular ou excreção antes de atingir o local de ação.

A liberação controlada de fármacos tem como principal objetivo o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos para que o efeito terapêutico do fármaco seja maximizado e os efeitos secundários minimizados (Liechty *et al.*, 2010). A liberação controlada implica a interação, física ou química, dos fármacos com sistemas biocompatíveis capazes de transportar o fármaco até ao tecido alvo em que deve atuar e/ou controlar a taxa de liberação do fármaco. Estes sistemas geralmente são designados por sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos (Horcajada *et al.*, 2006). No que diz respeito ao tratamento de feridas, os pensos curativos utilizados como SLC fornecem o meio adequado para administrar fármacos no local da ferida de forma consistente e sustentada durante longos períodos de tempo sem a necessidade de trocar o penso com frequência (Boateng *et al.*, 2008).

Alguns materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica têm sido os suportes dos SLC mais utilizados. Destes, os poliméricos são os materiais mais usados. Têm sido desenvolvidos SLC para o tratamento de feridas sob diversas formas como: (i) microesferas; (ii) nanopartículas poliméricas, de ouro e prata; (iii) lipossomas; (iv) nanopartículas lipídicas sólidas; (v) nano e micro-emulsões; (vi) filmes de nanofibras; (vii) hidrogéis; e (viii) espumas (Pachau, 2015). Neste trabalho, pretende-se desenvolver um SLC sob a forma de um hidrogel para aplicação em pensos curativos.

1.3 Hidrogéis

Os hidrogéis são estruturas tridimensionais compostas por cadeias poliméricas hidrofílicas capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluídos biológicos. Se a sua capacidade de retenção de água for 95% superior ao seu peso seco, o hidrogel é designado de superabsorvente (Lloyd *et al.*, 1998). As cadeias poliméricas hidrofílicas são reticuladas através de ligações covalentes ou de ligações não covalentes (interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou de *van der Waals*), podendo ser quimicamente estáveis, degradar-se, ou eventualmente desintegrar ou dissolver (Lloyd *et al.*, 1998; Hoffman, 2012). É, sobretudo, devido à sua capacidade de absorção e retenção de água, consistência, elasticidade e porosidade, que os hidrogéis apresentam características semelhantes ao tecido vivo natural (Boateng *et al.*, 2008; Caló *et al.*, 2015).

O primeiro hidrogel sintético - poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), PHEMA - para uso biológico, mais propriamente para lentes de contacto, foi desenvolvido nos anos 60 em 1960, por Wichterle e Lim (Wichterle e Lim, 1960). Desde essa altura que o número de referências sobre hidrogéis tem aumentado exponencialmente (Lee *et al.*, 2013). Os hidrogéis têm aplicações em diversas áreas como a agricultura, engenharia e medicina. Esta última pode ser dividida em várias subáreas, tais como, engenharia de tecidos e regeneração tecidual, sistemas de entrega de fármacos, diagnóstico, cicatrização de feridas, oftalmologia, cirurgia plástica, ortodontia, entre outras (Lee *et al.*, 2013; Chirani *et al.*, 2015).

Os hidrogéis são sintetizados de forma a serem flexíveis, duradouros, permeáveis a metabolitos, biocompatíveis e, se possível, biodegradáveis. Estes não devem reagir nem irritar a pele (Lloyd *et al.*, 1998; Boateng *et al.*, 2008), nem devem ser carcinogénicos, tóxicos ou radioativos.

A biocompatibilidade é uma das propriedades mais importantes e indispensáveis nos hidrogéis (Caló *et al.*, 2015). Esta define a capacidade do material estar em contacto com os tecidos e órgãos do corpo sem lhes causar danos ou sem desencadear uma resposta indesejável (reações inflamatórias, alérgicas ou tóxicas). Como não existem materiais totalmente inertes, há sempre uma resposta dos tecidos a qualquer corpo estranho inserido no organismo. No entanto é possível atenuar ou controlar essa resposta modificando os materiais (Shoichet, 2010).

A biodegradabilidade é particularmente desejável na área da libertação de fármacos, porque o material após ser introduzido no organismo e desempenhar a sua função não necessita ser removido, “desaparecendo” sozinho. Os processos que levam à degradação dos hidrogéis são: i) solubilização, em que a difusão da água leva ao inchaço do sistema que acaba por se

dissolver, dependendo da hidrofiliçidade do polímero, da interação polímero-polímero e polímero-água, e do seu peso molecular, bem como das condições ambientais, como pH, força iónica e temperatura; ii) hidrólise química, que consiste na hidrólise de ligações covalentes na cadeia carbonada (por exemplo, ligações éster, resultando na formação de um ácido carboxílico e um álcool), sendo afetada por vários fatores como a cristalinidade, o peso molecular e a hidrofiliçidade do polímero; iii) hidrólise enzimática, em que enzimas do tipo hidrolase clivam ligações covalentes, sendo a taxa de degradação do hidrogel dependente da sua difusão na rede do hidrogel e das condições ambientais; iv) a ionização ou troca iónica, dependente do pK_a dos grupos funcionais presentes no polímero e do pH no local de ação, da qual resulta a solubilização do hidrogel (Kamath e Park, 1993).

Consoante a sua natureza polimérica, os hidrogéis podem ser classificados em três grupos distintos: i) naturais, ii) sintéticos e iii) híbridos (uma mistura dos dois anteriores). De acordo com o método de reticulação, estes podem ser (i) químicos/permanentes ou (ii) físicos/reversíveis. Nos hidrogéis reticulados fisicamente são estabelecidas interações, mais fortes ou mais fracas, do tipo iónicas, pontes de hidrogénio, hidrofóbicas e/ou eletrostáticas, ao passo que, nos hidrogéis reticulados quimicamente, são estabelecidas ligações covalentes irreversíveis entre as cadeias do polímero. Os hidrogéis também podem ser diferenciados em (i) injetáveis, (ii) formados *in situ* após injeção dos precursores; ou (iii) pré-formados, implantados *in vivo* através de cirurgia. Por último, podem ser classificados de acordo com as características físico-estruturais que apresentam tais como porosidade, biodegradabilidade, capacidade de absorção e sensibilidade a condições ambientais (Chirani *et al.*, 2015; Ahmed, 2015).

Os polímeros sintéticos começaram a ser desenvolvidos no final do século XIX através de técnicas de síntese orgânica, por reações de polimerização, e podem ser facilmente encontrados no dia-a-dia, como por exemplo nos plásticos, borrachas e materiais fibrosos. Eles distinguem-se dos polímeros naturais porque permitem obter hidrogéis mais homogéneos, com propriedades físicas e químicas controladas e reprodutíveis. O processo de síntese permite controlar várias propriedades mecânicas como a resistência, tempo de degradação e estrutura e composição molecular quando comparado com os polímeros naturais (Tan e Marra, 2010).

As principais limitações dos polímeros sintéticos, muitas vezes, residem na falta de biocompatibilidade e degradabilidade em condições fisiológicas (biodegradabilidade). Sendo a biocompatibilidade uma propriedade fundamental, estes polímeros apresentam limitações porque ao estarem em contacto com tecido vivo provocam reações inflamatórias. Quando são implantados no organismo humano para desempenharem uma determinada função é desejável

que no fim sejam biodegradáveis. Porém, há situações em que a não biodegradabilidade é preferível, como por exemplo em lentes de contacto, pensos curativos, revestimentos, etc. Além disso, apresentam falta de bioatividade o que dificulta a adesão celular ao material, sendo combatida com a incorporação de elementos bioativos (Tan e Marra, 2010).

Os polímeros sintéticos mais usados na síntese de hidrogéis são o poli(etileno glicol) (PEG), o poli(ácido acrílico) (PAA) e derivados como PHEMA, poli (*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), o poli(álcool vinílico) (PVA), o poli(ácido lático) (PLA) e o poli(*N*-vinilpirrolidona) (PVP) (Lee e Yuk, 2007; Gibas e Janik, 2010; Tan e Marra, 2010; Kumar e Erothus, 2016). A estrutura química dos polímeros enunciados é apresentada na Figura 1.2.

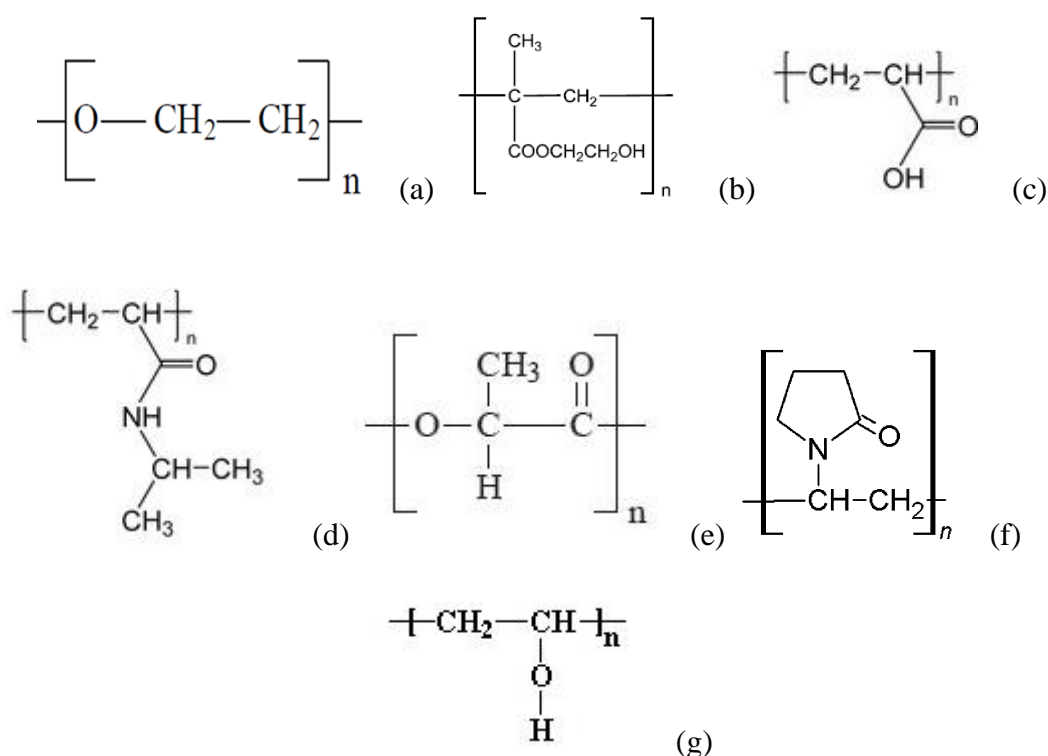


Figura 1.2 - Estrutura química de alguns polímeros sintéticos: (a) PEG; (b) PHEMA; (c) PAA; (d) PNIPAAm; (e) PLA; (f) PVP; e (g) PVA.

Como o próprio nome indica, os polímeros naturais, ou biopolímeros, podem ser encontrados na natureza ou fazem parte da estrutura de organismos vivos (plantas e animais). A sua síntese envolve processos biológicos (como a síntese por bactérias ou a fermentação) ou são resultado da combinação de unidades monoméricas, onde poderá haver ou não formação de subprodutos, geralmente água (Olatunji, 2015).

Estes biopolímeros são muito utilizados devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e semelhança à matriz extracelular (ECM), contendo domínios específicos

capazes de interagir com recetores celulares (Tan e Marra, 2010; Mogosano e Grumezescu, 2014). O facto de estes serem muito semelhantes aos encontrados nas matrizes dos organismos vivos faz com que exibam uma excelente bioactividade reduzindo a probabilidade de se desencadearem reações inflamatórias e, ainda, de ocorrerem problemas associados à toxicidade dos materiais e subprodutos da sua degradação. A biodegradabilidade dos polímeros naturais é essencial e traduz-se na capacidade destes serem metabolizados por mecanismos fisiológicos, tornando-os, assim, muito atrativos em aplicações biomédicas tais como tratamento de feridas, engenharia de tecidos, sistemas de libertação de fármacos e transplante de órgãos (Mogosano e Grumezescu, 2014).

Os polímeros de origem natural podem ser classificados em duas principais classes: (i) proteínas, das quais fazem parte o colagénio, gelatina, albumina, fibrina, queratina, fatores de crescimento, enzimas, entre outros; e, (ii) polissacarídeos, dos quais fazem parte a celulose, agarose, pectina, ácido hialurónico, quitosano, alginato, dextrano, amido, entre outros (Mogosano e Grumezescu, 2014; Kaushik *et al.*, 2016). Na Figura 1.3 é apresentada a estrutura química de alguns dos polímeros enumerados anteriormente.

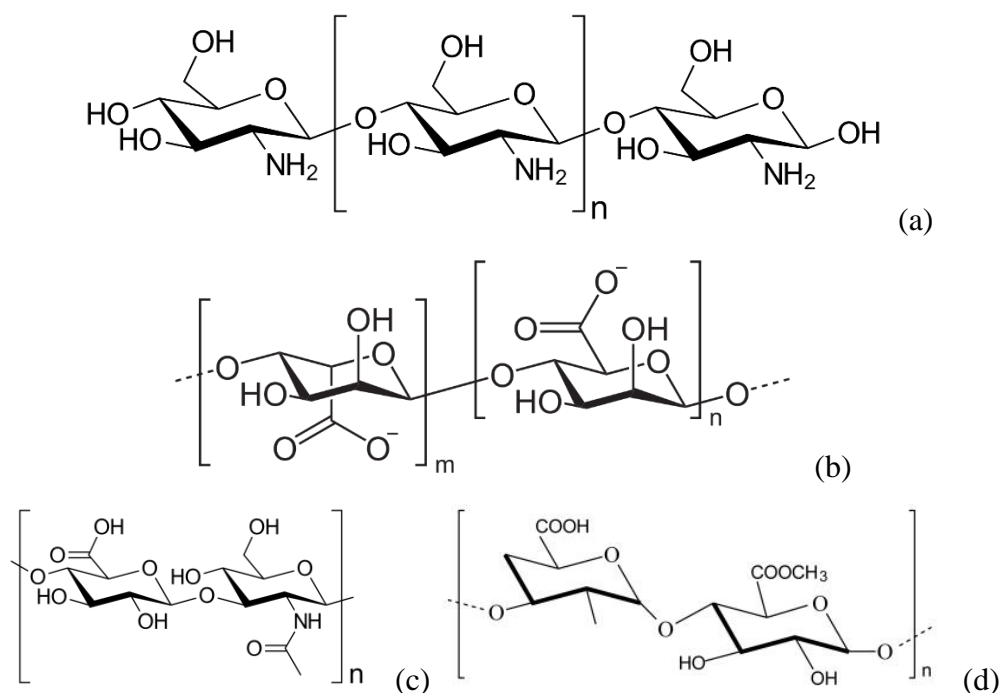


Figura 1.3 - Estrutura química de alguns polímeros naturais: (a) Quitosano (b) Alginato (em que m representa o ácido β-D-manurónico e n o ácido α-L-gulurónico); (c) Ácido hialurónico; e (d) Pectina.

1.4 Filmes à base de quitosano

1.4.1 Quitosano

Em 1859, Rouget decidiu tratar a quitina com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) e, descobriu que o composto obtido era solúvel em ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido málico, ácido fórmico e ácido succínico), intitulando-o de “quitina modificada”. Mais tarde, em 1894, Hoppe-Seyler tratou conchas de caranguejo, escorpião e aranhas, também, com uma solução de KOH e, conseguiu dissolvê-las em ácido acético e ácido clorídrico, dando-lhe o nome de quitosano (Novak *et al.*, 2003; Tamura e Furuike, 2014; Ahmed *et al.*, 2015).

A quitina é um material biológico presente no exoesqueleto dos invertebrados, crustáceos e na parede celular de fungos (Novak *et al.*, 2003; Jayakumar *et al.*, 2011) que, ao sofrer desacetilação alcalina dá origem ao quitosano. Quimicamente, a quitina e o quitosano são copolímeros das unidades *N*-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligadas através de ligações $\beta(1\rightarrow4)$ -glicosídicas, tal como representado na Figura 1.4.

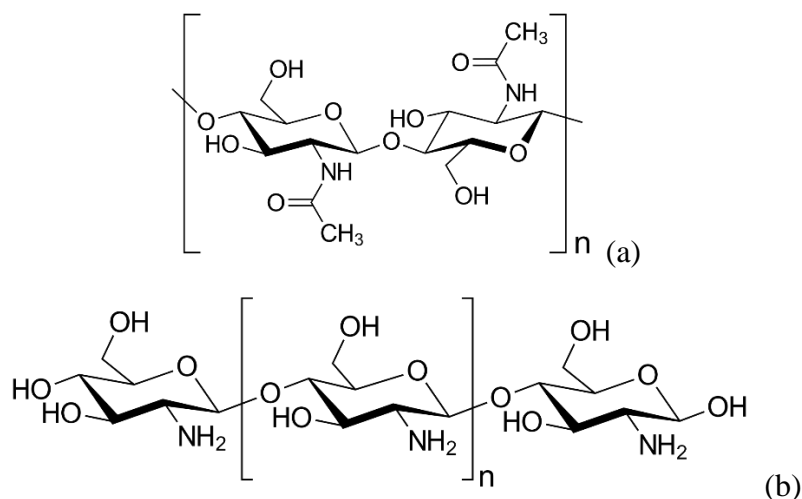


Figura 1.4 - Estrutura química de (a) Quitina e; (b) Quitosano.

Tanto o conteúdo como a sequência dessas unidades determinarão as propriedades físico-químicas e biológicas do polímero. Em condições heterogêneas de desacetilação, proporciona-se uma distribuição em bloco, enquanto em condições homogêneas, obtém-se uma distribuição aleatória dos grupos acetila (-COCH₃). Em meio ácido, o quitosano é de natureza catiónica e interage rapidamente com moléculas carregadas negativamente (tais como proteínas, alginato,

fosfolípidos, polissacarídeos aniônicos e ácidos nucleícos). No entanto, também pode quelatar metais (ajudando na remoção destes metais da água, por exemplo) (Lloyd *et al.*, 1998; Novak *et al.*, 2003; Prashanth e Tharanathan, 2007; Tamura e Furuike, 2014; Ahmed *et al.*, 2015).

O quitosano pode ser modificado quimicamente, de forma a alterar-se as suas propriedades físicas e biológicas. As modificações químicas dos grupos amina e hidroxilo podem ser levadas a cabo por diferentes métodos tais como reticulação, eterificação, esterificação e copolimerização de enxerto (Lloyd *et al.*, 1998).

O quitosano é descrito como biocompatível, biodegradável, não-tóxico, não-antigénico, bioadesivo, antimicrobiano, bioativo e hidratante (Jayakumar *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2015). Estas excelentes propriedades fazem com que possa ter aplicações promissoras em diversas áreas como a alimentação, biotecnologia e materiais, bem como na área biomédica, em *scaffolds* para engenharia de tecidos (dadas as semelhanças estruturais com glicosaminoglicano, atraindo fatores de crescimento), terapia génica, cicatrização de feridas (acelera a reparação do tecido, facilita a contração da ferida, estimula a proliferação de fibroblastos, a angiogénese e adesão celular, regula a secreção de mediadores inflamatórios e tem papel antimicrobiano), coagulação sanguínea (estimula a hemostasia e bloqueia as terminações nervosas), entrega de fármacos e como aglutinante de gordura (Prashanth e Tharanathan, 2007; Ahmed *et al.*, 2015). Os efeitos antibacterianos dos hidrogéis podem ser controlados por fatores intrínsecos incluindo o tipo de quitosano, o grau de polimerização, a composição química e as condições ambientais (Moura *et al.*, 2013).

Este polímero, nos últimos tempos, tem-se destacado pela sua versatilidade e propriedades intrínsecas, quando comparado com outros polímeros quer naturais, quer sintéticos. Tem-se dado ênfase ao seu uso em SLCs de fármacos para tratamento/cicatrização de feridas, uma vez que este estimula a hemostasia e acelera a regeneração do tecido (Patrulea *et al.*, 2015). Por tudo o exposto, foi este o polímero selecionado para ser usado neste trabalho.

1.4.2 Plastificantes

A principal função dos plastificantes é melhorar as propriedades mecânicas de um filme, aumentando a sua flexibilidade. A eficiência destes depende da sua estrutura química, compatibilidade e solubilidade com o polímero, e ainda do seu peso molecular, concentração e volatilidade (Wojciechowska, 2012). Os plastificantes são compostos capazes de aumentar a mobilidade das cadeias poliméricas, diminuindo a temperatura de transição vítrea. Estes podem

ser classificados como: (i) internos, que são co-mônómeros que interagem com as cadeias principais, deixando espaço entre elas, diminuindo a temperatura de transição vítrea; e, (ii) externos, que são moléculas com peso molecular baixo que interagem com as cadeias intermoleculares do polímero, rompendo as interações intermoleculares responsáveis pela falta de flexibilidade (Immergut e Mark, 1965).

Os filmes de quitosano na presença de um plastificante também apresentam maior elasticidade (Srinivasa *et al.*, 2007; Epure *et al.*, 2011). Os plastificantes não voláteis mais estudados são o glicerol, propilenoglicol (PG), etilenoglicol (EG), PEG e sorbitol. Segundo Suyatma *et al.*, o glicerol e o PEG são melhores que o PG e o EG, uma vez que apresentam melhor eficiência e estabilidade como agentes plastificantes e, por isso, foram utilizados neste trabalho.

1.4.3 Agentes reticulantes

Neste trabalho foram utilizados como agentes reticulantes dos filmes de quitosano a 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-*p*-toluenossulfonato (CMC), uma carbodiimida solúvel em água e o glioxal, um aldeído bifuncional (Figura 1.5), com o objetivo de interligar cadeias poliméricas através de ligações covalentes e tornar a estrutura do hidrogel mais rígida. Estas moléculas vão reagir com grupos carboxilo (CMC) e com grupos hidroxilo e amínicos (glioxal).

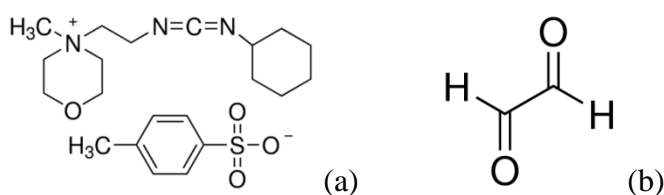


Figura 1.5 - Estrutura química de (a) CMC e; (b) Glioxal.

O glioxal pode reagir com grupos hidroxilo formando um acetal entre os grupos hidroxilo do quitosano e os grupos aldeído do glioxal a pH ácido (Figura 1.6 (a)), ou formando ligações imina entre os grupos amina do quitosano e os grupos aldeído do glioxal, a pH alcalino (Figura 1.6 (b)). Os filmes de quitosano reticulado com glioxal apresentam maior hidrofobicidade (Xu *et al.*, 2015).

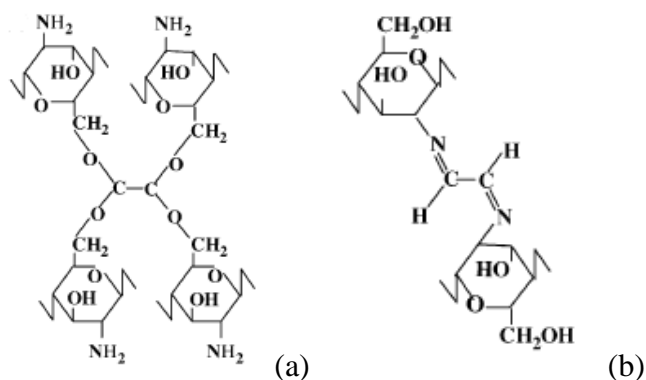


Figura 1.6 - Reticulação do quitosano pelo glioxal. (a) Glioxal reage com os grupos hidroxilo do quitosano; (b) Glioxal reage com os grupos amina do quitosano (adaptado de Yang *et al.*, 2005).

A CMC reage com os grupos carboxilo do ácido, através da ligação diimina, resultando no éster ativo característico, geralmente designado por intermediário ativo *O*-acilisoureira (Figura 1.7). O ataque nucleofílico nesse intermediário produz um derivado acilado do quitosano, resultante da reação com a amina do quitosano (Figura 1.8) (Hermanson, 2013; Cammarata, 2015). Podem ocorrer outras reações secundárias, como por exemplo, a hidrólise da CMC ou do intermediário ativo (Hermanson, 2013). Assim sendo, a reticulação do quitosano ocorre através da formação de ligações amida entre os grupos carboxílicos do ácido succínico e os grupos amina do quitosano (Figura 1.9).

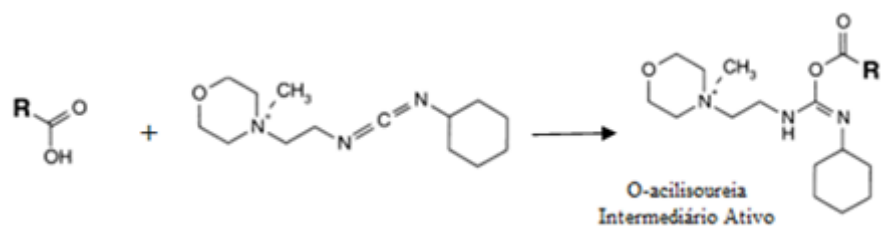


Figura 1.7 - Reação entre os grupos carboxílicos do ácido carboxílico com os grupos diimina da CMC, resultando no intermediário ativo *O*-acilisoureira.

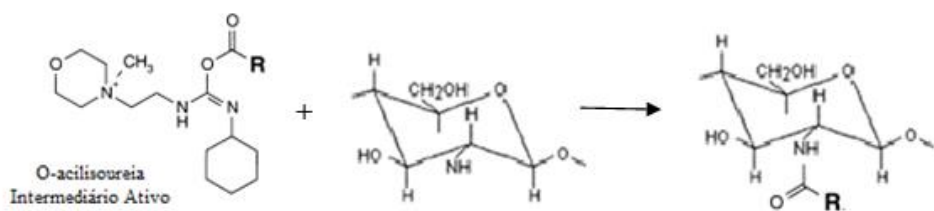


Figura 1.8 - Reação entre o intermediário ativo e o quitosano, resultando a formação de uma ligação amida entre o ácido e o quitosano.

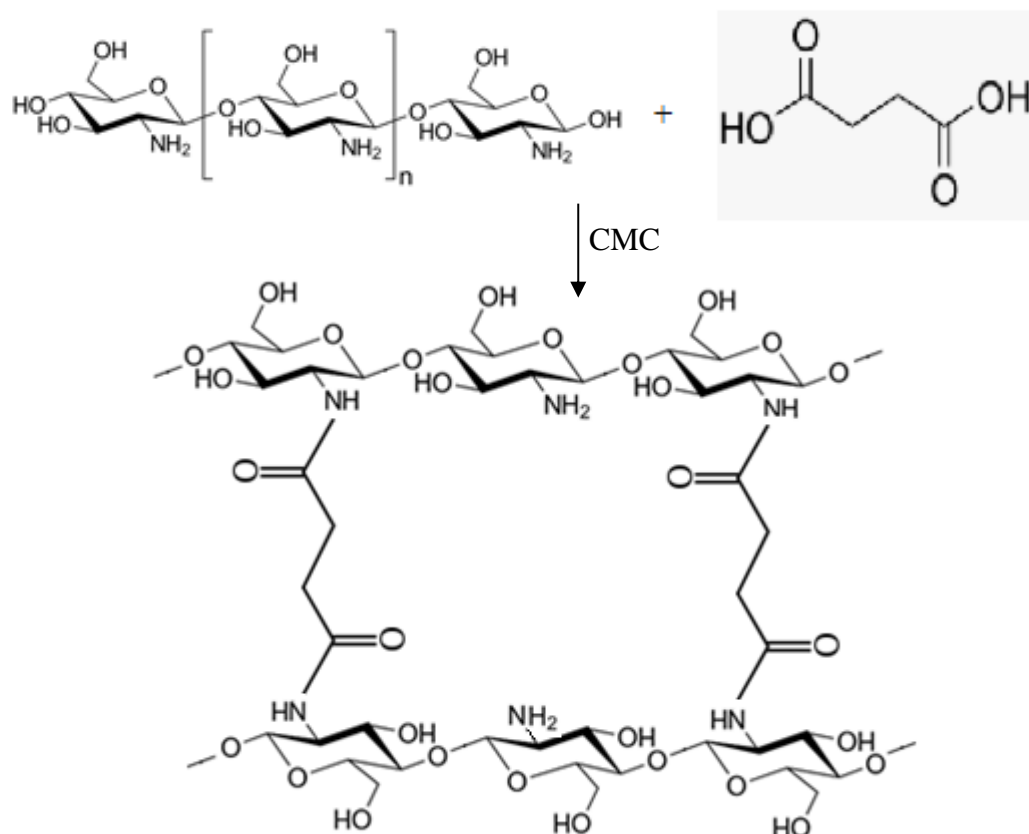


Figura 1.9 - Reticulação do quitosano pela CMC na presença de ácido succínico.

A presença destes agentes reticulantes permite melhorar as propriedades mecânicas dos filmes de quitosano, dependendo das condições reacionais, concentração, pH, temperatura e tempo da reação (Yang *et al.*, 2005).

1.5 Fármaco: PHMB

A poli(hexametileno biguanida), PHMB, ou polihexanida, cuja fórmula química é $(C_8H_{17}N_5)_n$, está representada na Figura 1.10, é um polímero usado como desinfetante e antisséptico, altamente solúvel em água (426 g/L) (Bernauer *et al.*, 2015). Ao contrário dos antibióticos que atuam seletivamente num alvo específico, os antissépticos têm múltiplos alvos e um espectro mais amplo de atividade, que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários. Os antissépticos são agentes antimicrobianos que matam, inibem ou reduzem o número de microrganismos e, por isso, amplamente utilizados em soluções desinfetantes na prevenção de infecções e tratamento de feridas (Atiyeh *et al.*, 2009; Barrett, 2017).

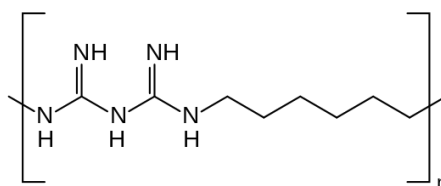


Figura 1.10 - Estrutura química da PHMB.

A PHMB é dos antissépticos mais utilizados porque é altamente histocompatível e não citotóxico (Atiyeh *et al.*, 2009). Em termos de biocompatibilidade, a PHMB mostrou-se superior a outros antissépticos muito utilizados, tais como, clorohexidina, iodo-povidona e triclosan (Vig, 2010). A sua atividade antimicrobiana deve-se à sua estrutura molecular e carga. Sendo um polímero catiónico, liga-se às membranas celulares dos microrganismos, que possuem carga elétrica predominantemente negativa, a ácidos nucleicos e outras moléculas carregadas negativamente (por exemplo fosfolípidos). Ao ligar-se à membrana celular, interfere com a sua estrutura, causando-lhe perda de integridade, que resulta na saída de componentes essenciais do citoplasma; ao ligar-se ao DNA e a ácidos nucleicos, causa o mau funcionamento da atividade metabólica e consequente morte das bactérias (Kirker *et al.*, 2009; Vig, 2010; Finnegan e Percival, 2015; Barrett, 2017; Ampawong e Aramwit, 2017). A PHMB é indicada como a primeira escolha no tratamento de feridas criticamente colonizadas e com risco de infeção, de queimaduras, na limpeza de feridas agudas e crónicas, e na prevenção de infeções cirúrgicas (Kramer *et al.*, 2018).

De modo a avaliar o efeito microbicida de um antibiótico ou de um antisséptico, existe um parâmetro designado MIC (do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*) que é a menor concentração que impede o crescimento de uma bactéria. Koburger *et al.* realizou um estudo comparativo da eficácia antimicrobiana de vários antissépticos utilizados no tratamento antisséptico da pele, feridas e mucosas com base em padrões internacionalmente aceites (Koburger *et al.*, 2010). Na Tabela 1.1 são apresentadas algumas das bactérias responsáveis pela colonização de feridas e respetiva MIC, para uma exposição de 24 h e 48 h à PHMB. Assim, para 24 h, a MIC da PHMB apresenta valores entre 0.5 e 4 mg/L e, para 48 h, entre 0.5 e 16 mg/L.

Tabela 1.1- MICs para uma exposição de 24 e 48 h de PHMB em algumas estirpes de microrganismos comuns em feridas (Koburger *et al.*, 2010).

Microrganismos	MIC _{24 h} (mg/L)	MIC _{48 h} (mg/L)	Microrganismos	MIC _{24 h} (mg/L)	MIC _{48 h} (mg/L)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	1	<i>Clostridium perfringens</i>	2	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	16	<i>Haemophilus influenzae</i>	2	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2	<i>Candida albicans</i>	1	1
<i>Escherichia coli</i>	0,5	1	MRSA* ¹	0,5	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	VRE* ²	4	8
MIC máxima	4	16		4	16

*¹ MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina); *² VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina)

1.5.1 Imobilização do fármaco

A cicatrização de feridas agudas pode ser acelerada apenas devido ao quitosano presente na constituição do hidrogel. No entanto, as feridas crônicas devem ser tratadas de maneira diferente. A imobilização/incorporação no hidrogel de um agente terapêutico com libertação lenta oferece um tratamento mais eficaz (Liu *et al.*, 2018).

O efeito dos SLC de fármacos preparados com quitosano não depende apenas das propriedades físicas e químicas do gel, mas também da forma como o agente terapêutico é imobilizado na rede tridimensional do hidrogel. Os três métodos possíveis para imobilizar o antisséptico no hidrogel estão representados na Figura 1.11 e são os seguintes: (i) permeação, (ii) oclusão e (iii) ligação covalente.

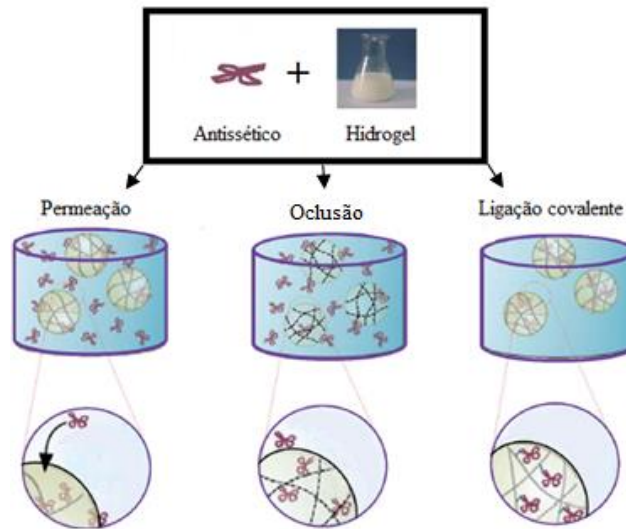


Figura 1.11 - Métodos de carregamento de agentes terapêuticos: (a) Permeação; (b) Oclusão; e (c) Ligação covalente (adaptado de Liu et al., 2018).

O método de permeação (*soaking*, em inglês) consiste na imersão do hidrogel numa solução de fármaco, com concentração conhecida, durante algumas horas. Este método permite que o hidrogel absorva a solução contendo o fármaco que, posteriormente, é libertado por difusão simples quando aplicado na ferida. A quantidade de fármaco absorvida é limitada pela solubilidade de equilíbrio do fármaco no hidrogel e a sua libertação leva apenas algumas horas.

Ao contrário do método anterior, a oclusão e a ligação covalente são levadas a cabo antes do processo de gelificação. Na oclusão, o fármaco é dissolvido na mistura que irá formar o hidrogel, permitindo que este fique retido na matriz polimérica. Enquanto na oclusão não há ligação covalente entre o fármaco e o hidrogel, na ligação covalente existe. Podem referir-se algumas vantagens da oclusão, como por exemplo, permite carregar quantidades muito pequenas ou muito elevadas de fármaco, simplicidade e a possibilidade de imobilizar diversos fármacos. Todavia, também apresenta desvantagens, como a possibilidade do fármaco se degradar durante o processo de gelificação, e a libertação do fármaco poderá ser muito rápida ou muito lenta, dependendo da porosidade do hidrogel, que está relacionada com o grau de reticulação dos SLC (Hoare e Kohane, 2008).

1.6 Análise da cinética de libertação do fármaco

O processo de transferência de massa por detrás do estudo realizado ao longo deste trabalho é a difusão. Este processo ocorre porque existe um gradiente de concentração, em que

o soluto (fármaco) em maior concentração (interior da matriz polimérica) migra para a zona onde se encontra em menor concentração (meio da ferida), até se atingir o equilíbrio. No entanto, dependendo da matriz polimérica, esta transferência de massa pode ser afetada pela relaxação das cadeias poliméricas. Alfrey, Gurner e Lloyd, em 1966, propuseram três classes distintas para qualificar o fenómeno de transferência de um material através de um polímero, de acordo com a taxa relativa de difusão do fármaco e de relaxamento dos polímeros (Crank, 1975):

- (a) Caso I ou difusão Fickiana, em que a taxa de difusão do fármaco é menor que a de relaxamento da matriz polimérica;
- (b) Caso II, em que a taxa de difusão do fármaco é muito rápida em comparação com os processos de relaxamento da matriz polimérica;
- (c) Difusão não-Fickiana ou anómala, em que as taxas de difusão do fármaco e relaxamento da matriz polimérica são análogas.

Para descrever a taxa de libertação de um fármaco a partir de diferentes sistemas de libertação de fármacos foram desenvolvidos alguns modelos matemáticos tais como: modelo difusional ou lei de Fick, modelo cinético de ordem zero; modelo cinético de primeira ordem; modelo de Higuchi; modelo de Korsmeyer-Peppas; modelo de massa – Hixson; modelo de Weibull; modelo de Baker-Lonsdale; modelo de Hopfenberg; modelo de Gompertz; e, modelo de camada superficial (Shaikh *et al.*, 2015). Entre os modelos apresentados apenas alguns se aplicam à geometria plana dos filmes desenvolvidos neste trabalho: os dois modelos de aplicação geral (modelo cinético de ordem zero e modelo cinético de primeira ordem), o modelo de Higuchi; e o modelo de Korsmeyer-Peppas (Shaikh *et al.*, 2015; Agrawal e Purwar, 2018), tendo sido esses os utilizados neste trabalho.

O modelo de ordem zero caracteriza um sistema em que a taxa de libertação do fármaco é independente da sua concentração. O sistema liberta o fármaco lentamente e não é degradável. Este modelo é descrito pela Equação 1,

$$Q_t = Q_0 - kt \quad \text{Equação 1}$$

onde Q_t é a quantidade de fármaco libertado e acumulado no instante t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco; e k é a constante de libertação de ordem zero. A quantidade de fármaco libertada é a mesma por unidade de tempo e as formas farmacêuticas que seguem este perfil são as seguintes: filmes transdérmicos, libertação controlada oral, comprimidos com fármaco de dissolução lenta e suspensões (Savale, 2016).

O modelo de primeira ordem caracteriza um sistema em que a taxa de libertação depende da concentração do fármaco e é descrita pela Equação 2.

$$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{kt}{2,303} \quad \text{Equação 2}$$

onde Q_t é a quantidade de fármaco libertado e acumulado no instante t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco; e k é a constante de libertação de primeira ordem. A representação gráfica apresenta do logaritmo da quantidade de fármaco acumulado em função do tempo resulta numa linha reta de declive $-k/2,303$. A forma farmacêutica que segue este perfil é: libertação controlada por dissolução da matriz (Savale, 2016).

Korsmeyer e outros colaboradores derivaram a relação que descreve a libertação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, tendo em conta a taxa de difusão do fármaco e a taxa de relaxamento da matriz polimérica, expressa na Equação 3:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad \text{Equação 3}$$

onde M_t é a massa de fármaco libertada no tempo t ; M_∞ é a massa de fármaco libertada no equilíbrio; k é a constante cinética característica do sistema; n é o expoente difusional, que depende do mecanismo de libertação e indica a ordem da cinética de libertação. A Equação 3 apenas é válida para os primeiros 60% da curva do perfil de libertação, ou seja, quando $0 \leq M_t/M_\infty \leq 0,6$ (Ritger e Peppas, 1987; Peppas e Shalin, 1989; Shaikh *et al.*, 2015). A Equação 4 permite calcular o coeficiente difusional, D , e depende da espessura do filme, l (Ritger e Peppas, 1987).

$$k = 4 \left(\frac{D}{\pi l^2} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

Na Tabela 1.2 são apresentados os possíveis valores que o expoente difusional pode tomar e qual o mecanismo de libertação e o modelo empírico que lhe corresponde, referente a filmes poliméricos.

Tabela 1.2 - Expoente difusional e respetivo mecanismo de libertação, para filmes poliméricos (Agrawal e Purwar, 2018; Romero *et al.*, 2018).

n	Mecanismo de libertação	Dependência do tempo
$\leq 0,5$	Difusão Fickiana (Caso I)	$t^{-0.5}$
$0,5 < n < 1$	Transporte anómalo/ não-Fickiano	t^{n-1}
$= 1$	Transporte Caso II	Ordem zero
> 1	Transporte Super Caso II	t^{n-1}

Encontrando-se o fármaco uniformemente distribuído na matriz polimérica, é necessário que este se dissolva no meio e só depois se difunda na matriz, de forma a ser libertado para o meio. Assim, a difusão Fickiana é o mecanismo que controla a libertação do fármaco e é caracterizada por uma taxa de difusão baixa quando comparada com a taxa de relaxamento da matriz polimérica, isto é, o processo de difusão é independente da relaxação da matriz polimérica. Este mecanismo é caracterizado por $n = 0,5$, que corresponde ao modelo de Higuchi (apresentado a seguir). Em processos não-Fickianos, a taxa de relaxamento da matriz polimérica é mais lenta que a de difusão do fármaco, limitando-a. Nestes processos podemos encontrar três tipos de casos diferentes (Romero *et al.*, 2018):

- i) Transporte anómalo ($0,5 < n < 1$), em que a taxa de difusão do fármaco e de relaxamento da matriz polimérica são idênticas;
- ii) Transporte Caso II ($n = 1$), em que a taxa de difusão do fármaco é superior à de relaxamento da matriz polimérica, sendo a libertação constante no tempo e, consequentemente, o modelo é de ordem zero;
- iii) Transporte Super Caso II ($n > 1$), em que a taxa de difusão do fármaco inicialmente é lenta, acelerando depois de atingir um certo valor.

Para se determinar o valor de n , representam-se os resultados obtidos no estudo de libertação num gráfico em que ao eixo das abcissas corresponde o logaritmo do tempo e, ao eixo das ordenadas, o logaritmo das massas libertadas acumuladas (Dash *et al.*, 2010). Assim, é possível obter os parâmetros n e k , em que n é dado pelo declive da reta obtida e k corresponde à ordenada na origem. Sabendo a espessura do filme, l , é possível calcular D pela Equação 4.

Finalmente, o modelo de Higuchi para libertação de fármaco através de matrizes é descrito pela Equação 5,

$$Q = k_H t^{1/2} \quad \text{Equação 5}$$

onde Q é a quantidade de fármaco libertado e acumulado no instante t ; e, k_H é a constante de dissolução de Higuchi. Tal como referido anteriormente, quando, no modelo de Korsmeyer-Peppas, $n = 0,5$, temos o modelo de Higuchi. Assim, tal como para o modelo de Korsmeyer-Peppas, só é válido para os primeiros 60% da curva do perfil de libertação, obtendo-se uma linha reta que representa a fração de fármaco libertado em função da raiz quadrada do tempo (Savale, 2016). Assim sendo, obtemos uma reta do tipo $f(t) = at^{0,5} + b$.

O modelo que melhor se ajusta aos resultados obtidos é escolhido tendo em conta um dos critérios de ajuste dos pontos experimentais à linha de regressão linear. Entre os critérios usados neste tipo de estudos, encontram-se o coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado}$; Equação 6) ou o AIC, do inglês *Akaike Information Criterion* (Cojocarú *et al.*, 2015). Neste trabalho, optou-se por seguir o $R^2_{ajustado}$ porque este tem em conta o número de parâmetros de cada modelo e o número de dados experimentais usados para construir a reta de regressão linear. Considerou-se que existiria um bom ajuste do modelo aos pontos experimentais quando $0,95 \leq R^2_{ajustado} \leq 1$.

$$R^2_{ajustado} = 1 - (n - 1) \frac{1 - R^2}{n - p} \quad \text{Equação 6}$$

onde n é o número de dados experimentais e p o número de parâmetros do modelo.

1.7 Estado de arte

Os pensos são materiais aplicados diretamente sobre as feridas com o objetivo de estancar hemorragias, absorver exsudato, aliviar a dor e proteger contra infeções, cuja forma física pode variar desde gazes a pomadas, espumas, fibras, hidrogéis, entre outras.

No mercado, é possível encontrar pensos nas mais diversas formas físicas (Tabela 1.3): hidrocolóide (GranuGel[®], DuoDERM[®] Gel, Biatain[®] Alginato Ag); gel amorfo (Nu-Gel[®], Intrasite[®] Gel e, AquaForm[®]); membrana (Opsite[®], Bioclusive[®] e, Tegaderm[®]); solução aquosa (Prontosan[®]); hidrogel (Hydrosorb[®], Purilon[®] Gel, Hypergel[®], Spenco 2nd Skin[®], Solosite[®], Vigilon e, Geliperm[®]); penso primário (Kaltostat). Relativamente a pensos à base de quitosano, podemos encontrar os seguintes: Celox[™], Aquanova[®] Ag Superabsorbent, Kytocel[®], Chitoderm[®] Plus, HidroKi[®], AbsorKi[®] e, HemCon[®] (Kytostat e ChitoFlex). Na Tabela 1.3 são apresentados os pensos acima mencionados e respetivos constituintes, características e

Tabela 1.3 – Principais pensos curativos comerciais nas diversas formas físicas e respetivas características e indicações de uso, existentes no mercado.

Nome Comercial	Componentes	Forma Física	Características	Aplicações	Fabricante
Nu-Gel ®	Alginato de sódio, propilenoglicol	Gel amorfo	-Auxilia o desbridamento autolítico natural -Facilita a reidratação da ferida	-Feridas com tecido necrótico ou desvitalizado -Feridas com pouco exsudato -Feridas crónicas	KCI medical Systagenix
DuoDERM ® Gel Hidroativo	Pectina, carboximetilcelulose de sódio	Hidrocolóide	-Mantem o ambiente húmido das feridas - Auxilia o desbridamento autolítico	-Feridas de espessura parcial e total -Úlceras de pressão, de perna e de pé diabético	ConvaTec
GranuGel ®	Pectina, carboximetilcelulose de sódio, propilenoglicol	Hidrocolóide	-Facilita a formação do tecido granulado -Reidrata as feridas -Absorve o excesso de exsudato	-Feridas de espessura parcial e total -Úlceras de perna e de pé diabético -Feridas cirúrgicas	ConvaTec
Intrasite ® Gel	Carboximetilcelulose de sódio modificada, propilenoglicol	Gel amorfo	-Absorve o excesso de exsudato -Promove o desbridamento autolítico, hidratação da ferida e reepitelização -Previne a dissecação	-Úlceras de pressão e de perna -Feridas cirúrgicas -Feridas secas e necróticas	Smith & Nephew Healthcare Limited
AquaForm®		Gel	-Hidrata as feridas -Promove o desbridamento do tecido necrótico -Absorve o excesso de exsudato	-Úlceras de pressão -Feridas pouco exsudativas	Aspen Medical
Prontosan®	Hidróxido de sódio	Solução aquosa	-Limpeza, descontaminação, tratamento e hidratação de feridas contaminadas	-Feridas agudas e crónicas -Queimaduras	B BRAUN
Hydrosorb®	Poliuretano	Hidrogel	-Auxilia o desbridamento -Atenua a dor -Controla a humidade das feridas	-Feridas muito exsudativas -Feridas clinicamente infetadas -Feridas crónicas (úlceras)	Hartmann

Tabela 1.3 – (continuação)

Nome Comercial	Componentes	Forma Física	Características	Aplicações	Referência
Purilon® Gel	Carboximetilcelulose de sódio, alginato de cálcio	Hidrogel	-Hidrata o tecido necrótico -Absorve o excesso de exsudato -Facilita o desbridamento autolítico	-Feridas necróticas secas e com crosta -Úlceras de perna, de pressão e de pé diabético não infetadas -Queimaduras de 1º e 2º grau	Coloplast
Biatain® Alginato Ag ⁺	Carboximetilcelulose de sódio, alginato, complexo iónico de prata	Hidrocolóide	-Efeito antimicrobiano contínuo -Efeito hemostático -Controla o leito das feridas e infeções	-Feridas infetadas moderada a intensamente exsudativas -Feridas de espessura parcial e total	Coloplast
Hypergel®	Cloreto de sódio, goma de xantana	Hidrogel	-Amolece e ajuda a remover tecido necrótico seco -Auxilia o desbridamento	-Feridas necróticas	Molnlycke Health care
Spenco 2 nd Skin	Óxido de polietileno	Hidrogel	-Reduz a dor local -Mante a humidade nas feridas	-Feridas provocadas por abrasão -Queimaduras pequenas -Pele danificada -Feridas exsudativas	Spenco Medical (UK) Lda
Solosite®	Carboximetilcelulose de sódio, glicerina, alantoína, álcool benzílico, metilparabeno, propilparabeno	Hidrogel	-Absorve o exsudato -Reidrata as feridas -Ajuda a remoção de tecido necrótico -Auxilia o desbridamento autolítico	-Feridas crónicas -Queimaduras menores -Lacerações superficiais -Úlceras de pressão, de perna e de pé diabético -Incisões cirúrgicas	Smith & Nephew Healthcare Limited
Vigilon	Óxido de polietileno	Hidrogel	-Mantem o ambiente húmido nas feridas -Reduz a dor local	-Feridas com danos da pele -Queimaduras leves -Feridas superficiais	Bard, distribuído por Seton Healthcare Group plc
Geliperm®	Agar, poliacrilamida, derivado acrílico	Hidrogel	- Reduz a dor local -Previne que o tecido braditrófico exposto seque -Auxilia na preparação do tecido em locais de transplantes	-Feridas agudas e crónicas, com perda de tecido e pele -Feridas superficiais -Queimaduras leves	Geistlich Sons Ltd

Tabela 1.3 – (continuação)

Nome Comercial	Componentes	Forma Física	Características	Aplicações	Referência
Kaltostat	Sais de sódio e cálcio, ácido algínico	Penso primário * ¹	-Fornecer um microambiente que facilita a cicatrização de feridas	-Feridas altamente exsudativas -Úlceras de pressão, de perna e de pé diabético -Feridas agudas -Feridas pós-cirúrgicas	ConvaTec
Opsite®	Poliuretano	Penso secundário * ²	-Serve de barreira contra contaminações -Favorece a regeneração do tecido -Mantem um ambiente húmido nas feridas	-Queimaduras de 1º e 2º grau -Feridas pós-cirúrgicas -Feridas superficiais	Smith & Nephew Healthcare Limited
Bioclusive®					Johnson & Johnson Medical Ltd
Tegaderm®					3M Health Care Ltd
Celox™	Quitosano	Gaze	-Ajuda no tratamento de sangramento traumático -Agente hemostático	-Feridas traumáticas, com sangramento	SAM Medical
AQUANOVA® Ag Superabsorbent	Quitosano, derivados do quitosano, prata iónica	Gel	-Absorve o excesso de exsudato -Mante um ambiente húmido para a cicatrização de feridas -Ajuda na remoção de tecido não viável das feridas -Auxilia o desbridamento autolítico	-Feridas de espessura parcial e total -Queimaduras de 1º e 2º grau -Úlceras de pé diabético, venosas, arteriais e de perna -Feridas cirúrgicas	Medtrade
Kytocel®	Quitosano	Filme	-Absorve o excesso de exsudato -Controla o sangramento -Agente hemostático	-Úlceras de pressão, de perna, de pé diabético -Feridas abertas -Feridas cirúrgicas -Queimaduras	Aspen Medical

*¹ penso que está em contacto com o leito da ferida; *² penso que fixa os pensos primários com capacidade de absorver exsudatos.

Tabela 1.3 – (continuação)

Nome Comercial	Componentes	Forma Física	Características	Aplicações	Referência
Chitoderm® Plus	Quitosano	Filme	-Absorve o excesso de exsudato -Agente antibacteriano -Mantem o ambiente húmido das feridas	-Feridas agudas e crónicas -Feridas contaminadas -Úlceras de pressão, de perna e de pé diabético -Feridas cirúrgicas -Queimaduras de 1º e 2º grau	Master aid - Hemicare
HidroKi®	Quitosano	Hidrogel	-Controlo da humidade das feridas	-Feridas crónicas -Úlceras de pressão -Queimaduras de 1º e 2º grau -Feridas superficiais	Ceramed
AbsorKi®	Quitosano	Penso primário	-Mantem o ambiente húmido -Auxilia no desbridamento natural autolítico -Protege de contaminações	-Feridas não exsudativas/ desidratadas -Queimaduras	Ceramed
HemCon®	Quitosano	Filme	-Controla hemorragias -Barreira antibacteriana	-Feridas agudas -Feridas profundas -Feridas faciais	Tricol Biomedical, Inc

aplicações. Estes são principalmente utilizados no tratamento de feridas para (i) criar um ambiente húmido favorável, (ii) promover o desbridamento autolítico natural, (iii) remover tecido necrótico, (iv) evitar contaminações e (v) estancar hemorragias. Deste modo, o processo de cicatrização será mais rápido e eficaz. Entre estes, os pensos sem quitosano não possuem nenhum antibiótico ou antisséptico que auxilie o processo de cicatrização de feridas, à exceção de Nu-Gel[®] e Solosite[®], que apresentam parabenos² e, Biatain[®] Alginato Ag contém prata³ o penso à base de quitosano, Aquanova[®] Ag Superabsorvent, também apresenta na sua constituição o agente antimicrobiano prata.

Entre exemplos de pensos que apresentam na sua constituição um antisséptico encontram-se Kerlix[™] AMD, Excilon[™] AMD e Telfa[™] AMD (com PHMB 0,2%), Kendall[™] AMD (com PHMB 0,5%), XCell[®], ActivHeal PHMB, Acticoat[™] e Inadine[®]. Gallant-Behm *et al.* testaram a capacidade de agentes antimicrobianos e pensos comerciais inibirem o crescimento de determinadas estirpes de bactérias, entre os quais o Kerlix[™] e o Acticoat[™]. Kerlix exibiu uma moderada a alta capacidade de inibir o crescimento da maioria das bactérias testadas dentro de um curto período de tempo de exposição. Já o Acticoat mostrou alta capacidade de inibir todas as estirpes de bactérias testadas. O que distingue estes dois pensos curativos é o antisséptico incorporado: enquanto Kerlix contém PHMB (0,2%), Acticoat liberta prata (Gallant-Behm *et al.*, 2005).

Outro estudo avaliou os efeitos de dois pensos curativos semi-oclusivos (penso que absorve exsudato impedindo que este entre em contacto com a pele adjacente saudável) – Telfa (filme de poliéster perfurado com algodão comprimido, que contém 0,2% de PHMB), um penso curativo oclusivo (penso que não impede a troca de ar ou fluídos, atuando como barreira mecânica e, ainda, promove isolamento térmico, veda a ferida de modo a impedir enfisema e formação de crosta) e um penso curativo biológico durante o período de cicatrização de feridas cirúrgicas. Entre estes, Telfa foi o penso curativo em que o período de cicatrização foi mais curto (Stashak *et al.*, 2004).

Suprasorb X[®] e XCell[®] são pensos curativos à base de celulose que têm a capacidade de hidratar ou absorver exsudato libertado nas feridas. Estes apresentam propriedades antimicrobianas uma vez que contêm PHMB (0,3%). Serafica *et al.* realizou alguns testes a fim de mostrar a elevada capacidade de XCell doar fluídos quando comparado com outros produtos presentes no mercado. XCell apresentou uma capacidade de doar mais de 75% de seu peso inicial, superando os outros produtos que doaram entre 9 e 31%. No que toca à capacidade de

² Compostos químicos usados como conservantes, dada a capacidade de eliminar microrganismos.

³ Composto químico usado como agente antimicrobiano.

absorção de fluídos, XCell apresentou resultados semelhantes aos outros produtos de ~72% do seu peso inicial (Serafica *et al.*, 2010).

ActivHeal PHMB é uma espuma antimicrobiana constituída por três camadas: (i) uma camada que está em contacto com a ferida impede a aderência do penso ao leito da ferida, impedindo o crescimento de tecido de granulação no penso, reduzindo o trauma durante a sua remoção; (ii) a almofada de poliuretano contendo PHMB, que é libertada na presença de exsudato e eficaz na prevenção de infeções e colonização bacteriana; (iii) um filme de poliuretano impermeável, que funciona como barreira bacteriana. Foi feita uma avaliação de ActivHeal PHMB em pacientes de várias faixas etárias, com níveis exsudativos e tipo de tecidos diferentes de modo a ver a sua eficácia. Barret concluiu que nenhuma ferida aumentou de tamanho, houve mudanças positivas nas dimensões das feridas, houve uma redução na dor sentida pelo paciente, e os níveis de exsudato diminuíram. Estes resultados revelam a eficácia na absorção de exsudato mantendo um ambiente de ferida húmido favorável à cicatrização (Barret, 2017).

Inadine consiste num tecido de baixa aderência, impregnado com uma base de polietilenoglicol (PEG) contendo 10% de iodopovidona (PVP-I), equivalente a 1% de iodo disponível. A base de PEG permite uma libertação controlada do iodo, isto é, a taxa de libertação do iodo depende da quantidade de exsudato na ferida proporcionando uma ação antibacteriana na sua superfície. Inadine: (i) é eficaz no tratamento de infeções localizadas (cura não cicatrizada sem aumento da ferida; aumento do nível de exsudato; tecido de granulação vermelho que pode sangrar ao remover o penso; e, odor desagradável devido a microrganismos que invadem o tecido superficial); (ii) permite uma libertação lenta e sustentada de iodo ligado a agentes de transporte, tornando-o mais seguro e minimizando os efeitos colaterais; (iii) a presença de PVP-I ajuda no processo de cicatrização, reduzindo a carga bacteriana e diminuindo a possibilidade de ocorrerem infeções; (iv) é utilizada na maioria dos tipos de feridas superficiais não curáveis (úlceras de pressão, de perna, de pé diabético e feridas pós-cirúrgicas) (Sibbald e Elliott, 2016). Dos restantes exemplos apresentados não foram encontrados estudos realizados.

Neste trabalho interessa desenvolver um hidrogel à base de quitosano capaz de controlar o ambiente da ferida, com incorporação de um antisséptico de modo a prevenir o risco de infeção, que se distinga dos já existentes no mercado. No entanto não foi possível encontrar um estudo de libertação realizado com um exemplo equivalente ao desenvolvido ao longo deste trabalho, isto é, um filme ou um penso à base de quitosano que libertasse PHMB ou outro antisséptico/antibiótico.

1.8 Técnicas de caracterização

1.8.1 Capacidade de inchaço

Durante o processo de cicatrização de feridas é importante controlar o teor de humidade de forma a minimizar o tempo de cura. O penso deve ter a capacidade de absorver o excesso de exsudato em feridas muito exsudativas e humedecer a ferida em feridas secas. A capacidade de inchaço (CS) de um material traduz a capacidade máxima que tem de absorver água. Pode ser calculada através da Equação 7,

$$CS (\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

onde m_t corresponde à massa do disco após a absorção máxima de água e m_0 à massa do disco seco.

1.8.2 Espetroscopia vibracional de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho por transformadas de *Fourier* (do inglês *Fourier-Transform InfraRed spectroscopy – FTIR*) é baseada no facto das ligações químicas, quando excitadas com radiação infravermelha, vibrarem a comprimentos de onda característicos. Quer isto dizer, que tipos específicos de ligações químicas são associados a valores de frequências vibracionais específicas e tabelados. Esta técnica pode ser combinada com uma ferramenta de amostragem ATR (*Attenuated Total Reflectance*) de modo a permitir estudar diretamente amostras no estado sólido ou líquido, sem preparação adicional. Um feixe infravermelho é direcionado a um determinado ângulo para o cristal ópticamente denso, com um alto índice de refração, que tem de estar em contacto com a amostra. O cristal reflete o feixe na sua superfície interna e, em cada ponto de reflexão, o feixe penetra cerca de 0,5 a 5 μm além do cristal e entra na amostra que se encontra em contacto com a sua superfície. Esta técnica foi empregue com o intuito de identificar as ligações químicas presentes no filme final.

1.8.3 Termogravimetria

A termogravimetria ou análise termogravimétrica (do inglês *ThermoGravimetric Analysis – TGA*) é uma técnica destrutiva do ramo das análises térmicas, na qual a variação de massa de uma amostra é monitorizada em função da temperatura ou do tempo, num ambiente de temperatura e atmosfera controladas. A amostra é colocada num suporte que se encontra conectado a uma balança e deixado na câmara de aquecimento. A temperatura é programada para variar no tempo segundo critérios pré-definidos, enquanto a balança fornece os dados da massa da amostra em função do tempo. O sistema de controlo da atmosfera é muito importante uma vez que os gases presentes no momento da análise podem ou não reagir com a amostra, influenciando diretamente as variações da massa. Os resultados finais obtidos são registados na forma de um gráfico, em que no eixo das abcissas é apresentada a temperatura e, no eixo das ordenadas a massa. A utilização desta técnica teve como objetivo verificar a que temperaturas ocorrem grandes variações da massa da amostra, devido à perda de componentes voláteis ou à sua decomposição térmica, e verificar se as variações de massa do quitosano não são alteradas devido à presença dos outros constituintes da formulação.

1.8.4 Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento, SEM (do inglês *Scanning Electron Microscopy*) permite obter imagens com uma gama de ampliação entre as 10× a 100000× e uma profundidade de campo até 30 µm. O princípio de funcionamento consiste no uso de um feixe de eletrões que é rastreado sobre a superfície da amostra. Um conjunto de eletrões, designados de eletrões secundários, desprende-se da amostra e é coletado num detetor, originando uma imagem topográfica da amostra. Para que a amostra emita eletrões, em primeiro lugar é necessário revesti-la com uma camada fina de um metal capaz de aumentar a sua capacidade condutora, geralmente ouro. Esta técnica foi realizada com o propósito de caracterizar a morfologia e a topografia da superfície da amostra final.

1.8.5 Goniometria de ângulos de contacto

O ângulo de contacto de uma gota de água sobre uma superfície é um indicador da molhabilidade dessa superfície. O ângulo de contacto θ_C (Figura 1.11) é definido a partir de uma gota de água em equilíbrio mecânico sobre uma superfície (gota séssil), devido à ação de três forças (tensões interfaciais): tensão interfacial sólido-gás ($\gamma_{s/g}$), sólido-líquido ($\gamma_{s/l}$) e líquido-gás ($\gamma_{l/g}$).

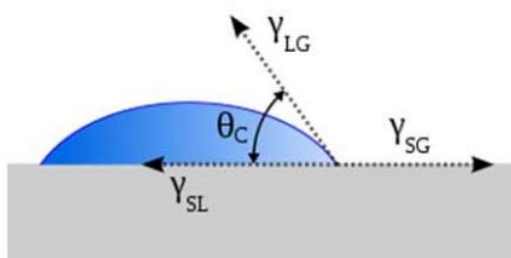


Figura 1.12 - Ângulo de contacto entre uma superfície sólida e uma gota de líquido.

A relação entre estas tensões interfaciais e o ângulo de contacto encontra-se expressa na Equação 8, conhecida como a equação de Young. A equação de Young só é válida quando estamos na presença de uma superfície sólida que seja lisa, plana, homogénea, inerte, insolúvel, não reativa e não porosa (Chau, 2009).

$$\gamma_{s/g} = \gamma_{s/l} + \gamma_{l/g} \cos \theta_C \quad \text{Equação 8}$$

Neste trabalho a goniometria de ângulos de contacto foi utilizada com o intuito de se determinar o tempo que o filme leva a absorver uma gota de líquido colocada sobre a sua superfície, dado que cedo se percebeu que não seria possível medir o ângulo de contacto dada a rápida penetração da gota na amostra e conseqüente intumescimento desta.

CAPÍTULO 2 – Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os reagentes utilizados na preparação dos filmes à base de quitosano foram os seguintes: quitosano (100 000 – 300 000 g/mol), da *Acrós Organics* (China); acetato de celulose (100 000 g/mol), da *Acrós Organics* (EUA); ácido D-lático (90%), da *Acrós Organics* (Bélgica); glicerol (99,95%) e acetona pura, de José Manuel Gomes dos Santos, Lda (Portugal); ácido acético glacial (100%), da *VWR Chemicals* (França) e ácido succínico (99,9%) provenientes da *VWR Chemicals* (Bélgica); alginato de sódio (10 000 – 600 000 g/mol), da *PanReac AppliChem* (Alemanha); CMC (>97%) e PEG (600 g/mol), da *Fluka* (Alemanha); glioxal (40%), da *BASF* (Alemanha); ácido hialurónico ($1,5 - 1,8 \times 10^6$ g/mol) e pectina, da *Sigma-Aldrich* (Alemanha). Foram ainda utilizados hidróxido de sódio (99,3%), da *VWR Chemicals* (República Checa) e tolueno (100%), da *VWR Chemicals* (França); HMDA (99,5%) da *Acrós Organics* (Bélgica); cloreto de sebacoílo (97%), da *AlfaAesar* (Alemanha).

Na preparação do meio para simular o exsudato das feridas foram usados os seguintes sais: cloreto de sódio (99,9%), da *VWR Chemicals* (Bélgica); cloreto de potássio (>99,5%), de José Manuel Gomes dos Santos, Lda (Portugal); fosfato de sódio, anidro (>98%), da *ChemLab NV* (Bélgica); bicarbonato de sódio (100%), da *Fisher Scientific* (Bélgica).

O antisséptico utilizado foi a PHMB (>94%), fornecida pela *Carbosynth*.

As frases de risco e de segurança presentes nas fichas de dados de segurança de cada reagente utilizado e considerado perigoso encontram-se sumarizadas no Anexo C.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos filmes à base de quitosano

A composição dos filmes à base de quitosano (FBQ) preparados ao longo do projeto pode ser vista na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição dos filmes à base de quitosano preparadas por evaporação do solvente.

Composição	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ
	1	1.1	2	2.1	2.2	2.3	3	4
Quitosano (% m/v)	2	2	2	2	2	2	2	1
Ácido lático (% m/v)	1	1	1	-	1	1	-	1
Ácido acético (% m/v)	-	-	-	1	-	-	1	-
Ácido succínico (% m/v)	2	2	-	-	-	-	-	-
Alginato de sódio (% m/v)	-	5	-	-	-	-	-	-
PEG (% m/v)	-	-	2	2	2	2	-	-
Pectina (% m/v)	-	-	-	-	-	-	2	1
Glicerol (% m/v)	5	5	-	-	5	2	-	-
CMC (% m/v)	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-
Glioxal (% v/v)	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5

Composição	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ	FBQ
	5	5.1	5.2	6	6.1	7	8
Quitosano (% m/v)	2	2	2	2	2	1,33	1,33
Ácido lático (% v/v)	-	1	-	1	-	0,67	0,67
Ácido acético (% v/v)	1	-	2	-	1	-	-
Pectina (% m/v)	-	-	-	-	-	-	-
Ácido hialurônico (% m/v)	-	-	-	-	-	0,05	0,17
CMC (% m/v)	-	-	-	1	1	0,67	0,67
Glioxal (% v/v)	-	-	-	-	-	-	-

Para avaliar o efeito do reticulante nas propriedades dos filmes, foram preparadas amostras, pelo método de evaporação do solvente, onde o quitosano foi dissolvido numa solução aquosa contendo 1% (v/v) de ácido lático (FBQ 1, FBQ 1.1, FBQ 2, FBQ 2.2, FBQ 2.3 e FBQ 4) ou 1% (v/v) de ácido acético (FBQ 2.1 e FBQ 3) utilizando um banho de ultrassons a uma temperatura de, aproximadamente, 35 °C, até se obter dissolução completa. Todos os outros reagentes foram adicionados depois do quitosano estar totalmente dissolvido, sendo o reticulante, CMC ou glioxal, adicionado em último. Em FBQ 3, o quitosano e a pectina foram dissolvidos, em separado, numa solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), e em FBQ 4, foram dissolvidos simultaneamente. De seguida, a mistura com um volume de 10 mL foi vertida para

a base de uma caixa de Petri de vidro com 5 cm de diâmetro. Todas as amostras foram colocadas numa estufa a 50 °C, durante 24 h, exceto FBQ 1 que esteve na estufa durante 72 h e FBQ 2.2 que foi colocada mais 5 h a 75 °C na estufa.

Foi adotado outro método de preparação de amostras - coagulação e evaporação do solvente -, procurando melhorar as propriedades dos filmes à base de quitosano. Assim, os filmes FBQ 5, FBQ 5.1 e FBQ 5.2 foram preparados dissolvendo o quitosano na solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) (FBQ 5), ácido acético a 2% (v/v) (FBQ 5.2) e ácido láctico a 1% (v/v) (FBQ 5.1). A mistura com um volume de 10 mL foi vertida para a base de uma caixa de Petri de vidro com 5 cm de diâmetro e colocadas na estufa a 50 °C durante 4 h. De seguida, mergulharam-se num banho gelado de NaOH (1 M), durante 60 min para FBQ 5 e FBQ 5.1 e durante 10 min para FBQ 5.2. Para terminar, as amostras FBQ 5 e FBQ 5.1 foram, novamente, colocadas na estufa a 50 °C durante 4 h, para secarem, enquanto FBQ 5.2 secou à temperatura ambiente durante 2 dias.

Foi novamente adotado o método de evaporação de solvente na preparação dos filmes FBQ 6 e FBQ 6.1 com adição de um reticulante, uma vez que os filmes obtidos por coagulação e evaporação do solvente não apresentam as propriedades adequadas para a aplicação pretendida. Assim, o quitosano foi dissolvido numa solução aquosa de ácido láctico a 1% (v/v) e ácido acético a 1% (v/v) para FBQ 6 e FBQ 6.1, respetivamente, e posteriormente foi adicionado o reticulante CMC. A mistura foi vertida para a base de uma caixa de Petri de vidro com 5 cm de diâmetro e levada à estufa a 50 °C, durante 24 h.

Para avaliar o efeito que a presença de ácido hialurónico tem nas propriedades dos filmes, preparou-se o filme FBQ 7. Começou por se dissolver o quitosano em 10 mL de solução aquosa de ácido láctico a 1% (v/v). O ácido hialurónico foi dissolvido em 5 mL de água destilada. De seguida, adicionou-se a solução aquosa de ácido hialurónico, gota a gota, sob agitação magnética, à solução de quitosano. A mistura foi vertida para a base de uma caixa de Petri de vidro com 5 cm de diâmetro, e levada à estufa a 50 °C durante 21 h.

Para melhorar as propriedades do filme obtido (FBQ 7), foi aumentada a concentração de ácido hialurónico e aplicado um tratamento à superfície do filme. Assim, prepararam-se dois filmes FBQ 8 pelo mesmo método que FBQ 7, com a exceção de terem sido colocados na estufa a 50 °C durante 48 h. Sobre o filme FBQ 8A foram colocados 2 mL de uma solução aquosa de hexametilenodiamina (HMDA) a 1% (v/v), durante 5 min. Depois de removido o excesso, foram adicionados mais 2 mL de uma solução de cloreto de sebacoílo (CSeb) a 1% (v/v) em tolueno. Removido o excesso, foi deixada a secar à temperatura ambiente. O outro

filme, FBQ 8B sofreu o mesmo tratamento, mas substituiu-se a solução aquosa de HMDA por uma solução aquosa de PEG a 1% (v/v).

Lavagem do filme

Para o primeiro ensaio de liberação os discos de FBQ 1 (3 discos sem fármaco – branco – e 3 discos sem fármaco para carregamento, com 1 cm de diâmetro) foram submetidos à lavagem em 15 mL de água destilada na incubadora, durante 24 h, a 37 °C e 100 rpm. O meio de lavagem foi mudado 2 vezes. Aquando a realização do Ensaio 1 de liberação, verificou-se que o método de lavagem não foi eficaz, dada as elevadas absorvâncias do branco, pelo que, para os Ensaio 2 e 3, os discos foram lavados em 15 mL de água destilada nas mesmas condições que no Ensaio 1, com renovação do meio de lavagem de 5 vezes.

2.2.2 Carregamento do fármaco

Uma vez que os discos devem ser lavados (procedimento na secção 2.2.1) e secos antes do carregamento do fármaco, a PHMB foi carregada em FBQ 1 através do método de permeação (*soaking*), após a sua lavagem. Três discos foram imersos em 5 mL de uma solução contendo 0,5 mg de PHMB por mL de fluido pseudoextracelular (do inglês *Pseudo ExtraCellular Fluid - PECF*) (secção 2.2.4), e deixado numa incubadora *Thermoshake* TH500/1-THL/500/1 (*Thermoshake* Gerhardt, Alemanha) com agitação orbital (100 rpm), durante 18 h, a 37 °C.

2.2.3 Quantificação do fármaco carregado

A quantidade de fármaco carregado foi calculada com base na absorvância ao comprimento de onda a que a PHMB absorve maximamente (236 nm), de amostras da solução de carregamento antes e após o carregamento, utilizando um espectrofotómetro JASCO V-550 UV-VIS (Japão). A conversão da absorvância em concentração foi feita utilizando uma curva de calibração preparada com um conjunto de soluções de PHMB com concentrações conhecidas, entre os 2,5 e 50 µg/mL. tendo em conta o fator de diluição da amostra (Figura B.1, do Anexo B).

2.2.4 Estudos de liberação do fármaco

A solução salina utilizada como modelo do exsudato da ferida, designada PECF (Lin *et al.*, 2001), foi preparada em água Milli-Q[®] possuindo um pH de $7,4 \pm 0,2$, uma força iônica de 0,48 M, sendo a sua composição apresentada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição do fluido pseudo-extracelular (Lin *et al.*, 2001).

Sais	NaCl	KCl	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄
Concentração (g/L)	6,8	2,2	25,0	3,5

O estudo de liberação foi realizado utilizando discos com 1 cm de diâmetro, cortados com um vazador de rolhas a partir dos filmes preparados, e carregados com PHMB. Estes discos foram colocados em tubos de *Falcon* de 15 mL contendo 12 mL de PECF, em triplicado. Os tubos foram colocados na incubadora a 37 °C, sob agitação (100 rpm).

Antes da colocação dos discos nos tubos de *Falcon*, estes foram rapidamente mergulhados em água destilada e a sua superfície seca com papel absorvente, com a finalidade de remover solução de PHMB existente na superfície do disco, proveniente do carregamento do disco por permeação.

Antes do carregamento, os discos foram lavados de modo a remover restos dos reagentes utilizados na sua preparação que pudessem lixiviar para a solução de PECF e absorver ao mesmo comprimento de onda usado na quantificação da PHMB libertada.

Para determinar a quantidade de fármaco libertado, foram removidas alíquotas de 1 mL e, subsequentemente, repostas o mesmo volume de PECF fresco, a tempos pré-definidos. A quantidade de fármaco libertado foi calculada através da absorvância medida a 236 nm da alíquota, após diluição adequada. A conversão da absorvância em concentração e em massa de fármaco foi feita tendo em conta a diluição utilizada e a curva de calibração preparada, presente na Figura B.1, do Anexo B.

Os perfis de liberação obtidos representam a massa de PHMB libertada e acumulada por massa de disco seco, em função do tempo, tendo sido efectuados sob condições “*sink*”: o volume do meio de dissolução é 3 a 10 vezes superior ao volume necessário para atingir a saturação de fármaco nesse meio (European Pharmacopoeia, 2008).

2.3 Caracterização do filme

2.3.1 Capacidade de inchaço

Para o estudo da capacidade de inchaço, inicialmente, foram cortadas 3 amostras com 2 cm de diâmetro. Depois, foram colocadas na estufa a vácuo, a 40 °C, até se obter um peso constante (massa do disco seco, m_0). Posteriormente, as amostras foram colocadas em tubos de *Falcon* de 15 mL com 3 mL de uma solução aquosa de NaCl com 0,9% (m/v), e deixadas na estufa a 37 °C. Em períodos de tempos pré-definidos, as amostras foram retiradas da solução, removeu-se o excesso da água superficial com um papel absorvente e pesou-se a amostra (m_t). As amostras foram devolvidas à solução e este processo repetiu-se até se obter um peso constante, calculando-se a capacidade de inchaço através da Equação 7.

2.3.2 Espetroscopia de Infravermelhos

Os espectros de FTIR-ATR do filme à base de quitosano foi registado entre 500 – 4000 cm^{-1} num espectrómetro de FTIR-ATR *Frontier*TM, da *PerkinElmer* (Massachusetts, EUA). Para obter o espectro apresentado foram acumulados 128 espectros, obtidos à temperatura ambiente, com uma resolução de 4 cm^{-1} , utilizando o acessório de ATR.

2.3.3 Termogravimetria

Utilizou-se o analisador termogravimétrico TGA Q-500 da *TA Instruments Company* (New Castel, EUA). As análises foram feitas aumentando a temperatura desde 25 a 600 °C, numa atmosfera de azoto com um caudal de 40 mL/min e uma variação da temperatura de 10 °C/min.

2.3.4 Microscopia eletrónica de varrimento

A morfologia do filme à base de quitosano foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento (FE-SEM; *Field Emission Scanning Electron Microscope*, ZEISS MERLIN, Gemini II - Alemanha). Inicialmente, a amostra foi revestida com uma camada de ouro e, posteriormente, colocada na câmara do SEM para se observar a sua superfície. Observou-se, também, uma secção transversal da amostra. A amostra foi cortada à temperatura ambiente e rasgada manualmente uma vez que o uso de uma tesoura iria provocar uma deformação do filme, e colocada na horizontal no porta-amostras.

2.3.5 Goniometria de ângulos de contacto

A medição do ângulo de contacto foi tentada pelo método da gota séssil empregando um goniómetro de ângulo de contacto OCA-20 da *Dataphysics* (Alemanha). Com o auxílio da câmara de vídeo do goniómetro, com a qual se tem uma visão de perfil da gota, o ângulo de contacto é calculado automaticamente pelo *software* do equipamento.

Inicialmente, uma amostra do filme é colocada sobre o suporte do goniómetro, na qual se deixou cair uma gota com 10 µL de PECF, e, posteriormente, fez-se a leitura do ângulo de contacto. Em simultâneo, foi medido o tempo que a gota levava até desaparecer da superfície do filme, por penetração nele.

CAPÍTULO 3 – Resultados e Discussão

3.1 Preparação dos filmes à base de quitosano

Foram preparados diversos filmes à base de quitosano com diferentes reagentes, concentrações e métodos de preparação. Estes filmes destinam-se a uma aplicação na preparação de um sistema de libertação controlada de um fármaco, para uso como penso curativo. Na Figura 3.2 é possível encontrar o aspeto visual dos filmes preparados. No Anexo A é possível encontrar a Tabela A.1 com as principais características dos filmes à base de quitosano, a sua composição, método de preparação e aspeto visual.

O filme FBQ 1 apresenta uma coloração amarelada, com origem no próprio quitosano em pó que foi utilizado na sua preparação. Isto deve-se, possivelmente, à presença de impurezas no quitosano utilizado. O filme possuía uma espessura inferior a 1 mm, é flexível, resistente e com capacidade de adesão.

Pela observação da Figura 3.2 é possível verificar que, quando se tentou adicionar outro polímero natural à formulação de quitosano (FBQ 1.1, FBQ 3 e FBQ 4), não se conseguiram obter filmes homogéneos. Em FBQ 1.1, o alginato de sódio foi dissolvido após dissolução total do quitosano e ácido succínico. Em FBQ 3, o quitosano e a pectina foram dissolvidos em soluções separadas, e, quando adicionadas uma à outra, formou-se um precipitado na interface. De modo a evitar que se formasse o precipitado, tentou dissolver-se simultaneamente o quitosano e a pectina na solução aquosa de ácido láctico. No entanto, não se conseguiu. Isto aconteceu, provavelmente, porque estamos perante polímeros com cargas elétricas opostas, formando complexos de polieletrólitos (PEC). Uma representação esquemática da formação do PEC entre a pectina e o quitosano é apresentada na Figura 3.1.

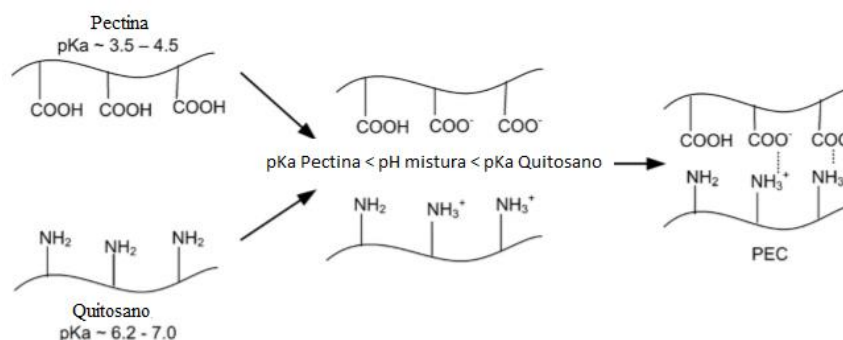


Figura 3.1 - Esquema da formação do PEC entre a pectina e o quitosano (adaptado de Coimbra et al., 2011).

Estes PEC são o resultado das interações eletrostáticas, fortes e reversíveis, entre os grupos carboxílicos da pectina/alginato, carregados negativamente, e os grupos amina do quitosano, carregados positivamente. A formação de PECs ocorre com maior eficácia na faixa de pH entre 3-6, ou seja, o pH da mistura deve estar entre os valores do pK_a da pectina e alginato (3.5-4.5; 3,38-3,65, respetivamente) e do pK_a do quitosano (6,2-7,0) (Coimbra *et al.*, 2011). Comparando FBQ 3 e FBQ 4, podemos ver que a quantidade de precipitado é menor em FBQ 4. Isto poderá dever-se à presença do reticulante, que evita a interação direta entre as cadeias poliméricas da pectina com o quitosano, evitando a formação do PEC.

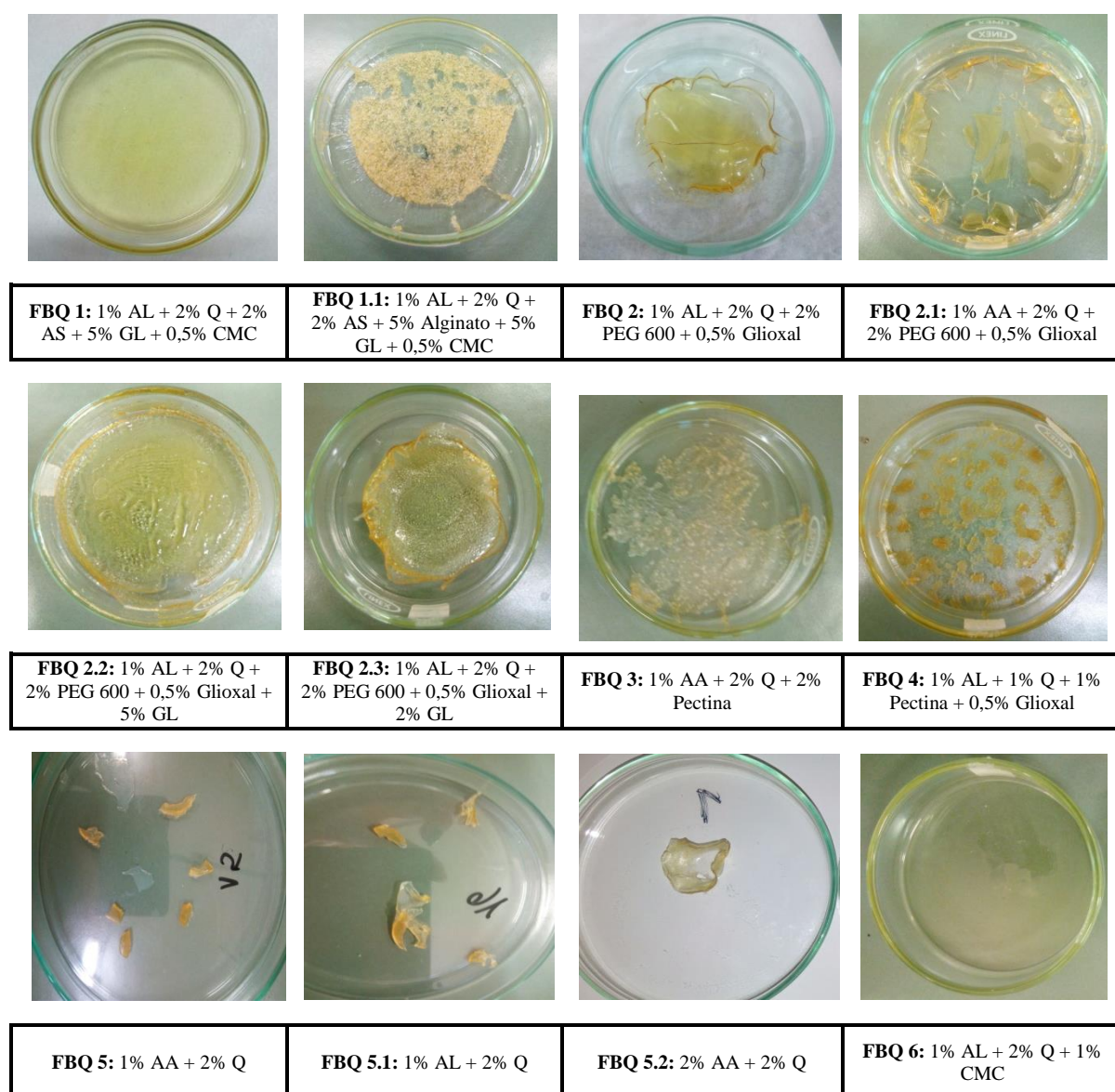


Figura 3.2 - Aspeto visual dos filmes à base de quitosano preparadas em laboratório.

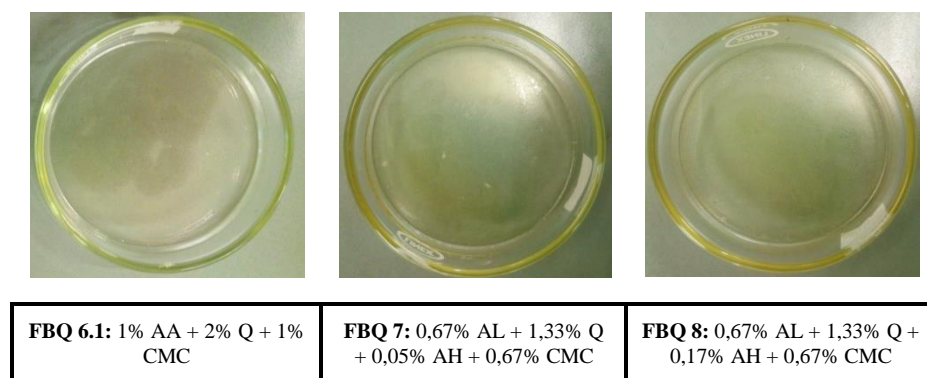


Figura 3.2- (continuação).

Os filmes FBQ 2 a 2.3 foram preparados empregando o polímero sintético, PEG 600, em vez de um polímero natural. Quando preparado com ácido acético, FBQ 2.1 mostrou-se mais fino e mais frágil do que FBQ 2, que foi preparado em ácido láctico. Como FBQ 2 era rígido, mas frágil, adicionou-se o plastificante glicerol à formulação, de modo a tentar torná-lo mais flexível (FBQ 2.2). Após 24 h a 50 °C, verificou-se que ainda havia glicerol na superfície do filme e, por isso, colocou-se novamente na estufa, durante 5 h, aumentando a temperatura para 75 °C. Todavia, continuou a existir glicerol na superfície do filme, como se pode observar na Figura 3.2. Deste modo, a concentração de glicerol foi reduzida (FBQ 2.3). Este, quando comparado com FBQ 2.2, ainda apresentou algum glicerol na superfície, mas em menor quantidade, e o seu diâmetro era inferior; quando comparado com FBQ 2, mostrando, ainda, ser mais resistente e menos frágil, uma vez que era possível dobrá-lo sem que se partisse.

Dada a dificuldade em obter filmes com as propriedades necessárias para a aplicação pretendida e de modo a diminuir o tempo de preparação do filme, testou-se outro método que consiste na pré-evaporação da solução de quitosano numa estufa, seguido da sua imersão num banho gelado e, finalmente, nova evaporação na estufa. Por observação da Figura 3.2, podemos ver que os filmes FBQ 5 a 5.2 não apresentam o mesmo tamanho que os outros filmes. FBQ 5 e FBQ 5.1, depois da coagulação no banho de NaOH, quebraram ao serem manuseados. De modo a desidratar os filmes, estes foram colocados na estufa, como referido na secção 2.2.1. Podemos ver na Figura 3.2 que diminuíram bastante de tamanho. A elevada concentração da solução de NaOH aquando a coagulação dos filmes fez com que FBQ 5 e FBQ 5.1 ficassem muito rígidos (muito reticulados), não sendo possível dobrá-los sem que se partissem. Além disso apresentam um tamanho muito reduzido. FBQ 5.2 não se apresenta tão partido como FBQ 5 e FBQ 5.1, uma vez que se teve maior cuidado no manuseamento. Dadas as dificuldades apresentadas com os outros filmes do mesmo tipo. A concentração da solução de NaOH deverá

ser reajustada de modo a obter filmes menos reticulados e com as propriedades necessárias para a aplicação pretendida.

Os resultados obtidos com os filmes preparados pelo método anterior não foram os melhores e por isso voltou-se a usar o método de evaporação do solvente, com a adição de um reticulante (CMC) para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes. Surgiram, assim, os filmes FBQ 6 e FBQ 6.1, cuja diferença reside na solução aquosa de ácido, sendo utilizado o ácido láctico e o ácido acético, respetivamente. Tanto FBQ 6 como FBQ 6.1 eram extremamente finos e não se conseguiram remover da caixa de Petri depois de evaporado todo o solvente. Assim sendo, foi necessário hidratar os filmes para que se conseguissem remover. Os filmes hidratados revelaram-se muito frágeis e quebradiços e depois de secos, à temperatura ambiente, ficaram extremamente finos e flexíveis, mas rasgavam com facilidade.

Como os filmes FBQ 6 e 6.1 se revelaram frágeis, introduziu-se o AH e diminuiu-se o tempo da reação para 50 °C, surgindo assim FBQ 7. Este mostrou ser flexível, mas extremamente fino, frágil e difícil de remover da caixa de Petri.

Visto que se obtiveram melhores resultados quando se introduziu o AH (FBQ 7), então tentou-se aumentar a sua concentração. O filme obtido, FBQ 8, apresentou propriedades semelhantes às de FBQ 7.

De modo a tornae o filme FBQ 7 mais resistente, foram feitos dois tratamentos distintos à superfície dos filmes. O primeiro tratamento foi feito com uma solução aquosa de HMDA e uma solução de cloreto de sebacoílo em tolueno (FBQ 8A); o segundo tratamento, foi feito com uma solução aquosa de PEG, seguida de uma solução de cloreto de sebacoílo em tolueno (FBQ 8B). Na Figura 3.3 é possível observar o aspeto visual dos filmes FBQ 8 após tratamento.

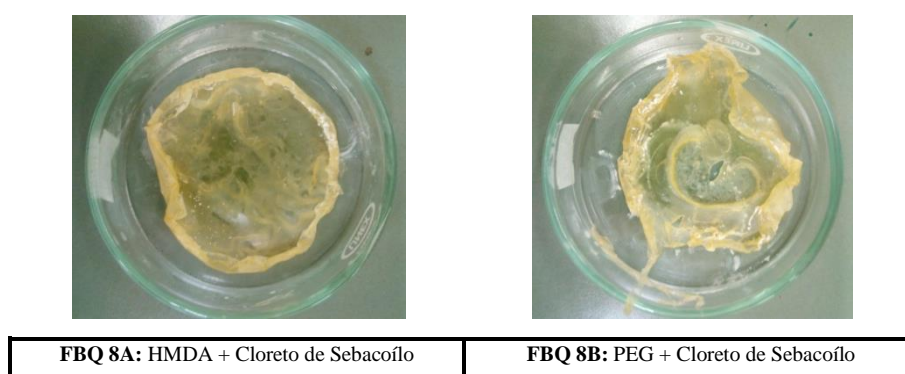


Figura 3.3 - Aspeto visual do filme FBQ 8 após tratamento.

Por observação da Figura 3.3 pode ver-se que FBQ 8A apresenta melhor aspeto que FBQ 8B. O filme FBQ 8A revelou-se flexível e resistente e a sua superfície não apresentava cortes nem

irregularidades. O mesmo não se pode dizer de FBQ 8B, que apresentava defeitos na superfície e era menos flexível que FBQ 8A.

3.2 Seleção da formulação

Dos filmes apresentados na secção anterior, foram logo excluídos alguns filmes por não serem homogêneos - FBQ 1.1, FBQ 3 e FBQ 4; por não se ter conseguido obter um filme - FBQ 2.1; e, porque eram demasiado rígidos, pouco flexíveis para a aplicação que pretendida e não apresentavam tamanho suficiente para continuar com os estudos - FBQ 5, FBQ 5.1 e FBQ 5.2.

Os filmes FBQ 2.2 e FBQ 2.3 também foram excluídos, uma vez que apresentavam um excesso de glicerol na superfície e, por isso, seria necessário otimizar a sua quantidade, o que não foi feito por falta de tempo.

Já os filmes FBQ 6, FBQ 6.1 e FBQ 7 eram extremamente finos e não se conseguiam retirar da caixa de Petri, sendo necessário hidratá-los. Visto serem tão finos, depois de hidratados acabaram por se rasgar, e por isso excluídos do estudo.

Um dos principais requisitos para que os filmes possam ser utilizados em pensos curativos, é que estes não se dissolvam no exsudato das feridas durante o tratamento. Como tal, a resistência à dissolução em água foi avaliada. FBQ 2 não se dissolveu nem inchou ao fim de algumas horas, pelo que foi excluída do estudo. Já FBQ 1 e FBQ 8 não se dissolveram.

O filme FBQ 8B foi, também, excluído uma vez que apresentava irregularidades na superfície do filme.

Em suma, restaram os filmes FBQ 1 e FBQ 8A. De modo a avaliar se eram adequados para a aplicação pretendida e para os estudos a realizar, foram colocados em água destilada numa incubadora a 37 °C e 100 rpm, com troca da água de lavagem em tempos pré-definidos, de modo a avaliar o seu comportamento durante um período de tempo mais prolongado e, em simultâneo, proceder à lavagem dos filmes. O filme FBQ 1 foi lavado durante 1 dia, na forma de discos com 1 cm de diâmetro uma vez que, ao fim de alguns minutos em contacto com a água começou a enrolar-se, tornando-se frágil. Já FBQ 8A foi lavado com o seu tamanho original, mas passado 1 dia, aproximadamente, acabou por se desfazer. Assim sendo, o filme selecionado para os estudos subsequentes de carregamento e libertação do fármaco foi FBQ 1.

3.3 Caracterização do filme selecionado

3.3.1 Capacidade de inchaço

Na Figura 3.4 é possível observar a evolução da capacidade de inchaço do filme FBQ 1 até atingir o equilíbrio numa solução de NaCl a 0,9%.

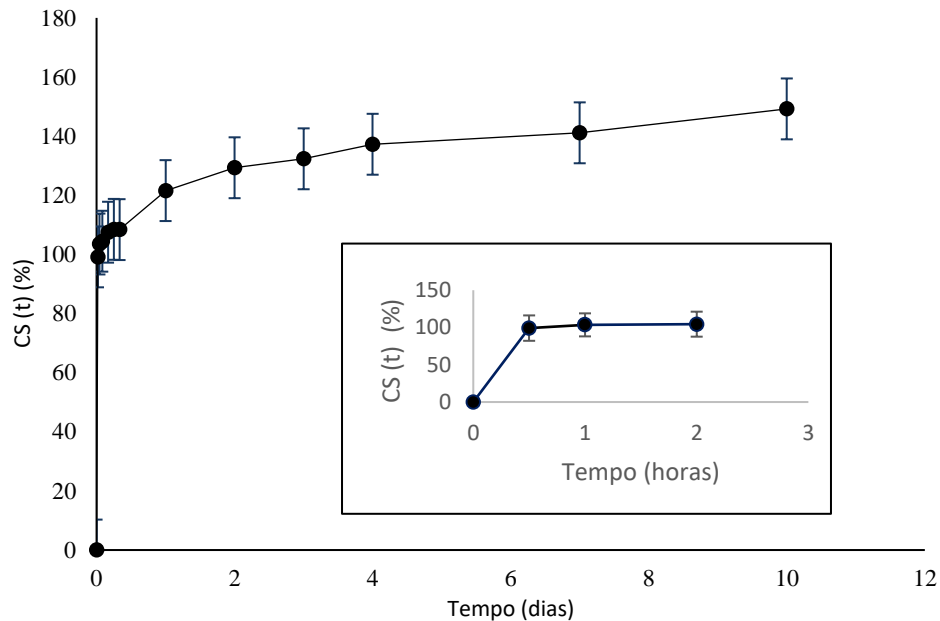


Figura 3.4 - Variação da capacidade de inchaço de amostra do filme FBQ 1 até ser atingido o equilíbrio, em função do tempo de imersão numa solução de NaCl (0,9%) a 37 °C ($n = 3$, SD). Inserção: Ampliação das 2 horas iniciais da curva. CS (t) é a capacidade de inchaço no instante t.

Por observação da Figura 3.4 conseguimos ver que a massa de FBQ 1 hidratado tem um aumento significativo na primeira meia-hora em que este é mergulhado na solução aquosa de NaCl (0,9%). Nos dias seguintes, FBQ 1 continua a absorver água, mas em quantidades muito inferiores às primeiras horas. Ao fim do sétimo dia, FBQ 1 atinge o equilíbrio, isto é, a amostra não consegue absorver mais água, apresentando uma CS de 141%. Em suma, FBQ 1 apresenta-se como capaz de absorver rapidamente o excesso de exsudato em feridas muito exsudativas e deverá ser capaz de manter o ambiente húmido ideal para o tratamento de feridas.

3.3.2 Espectroscopia de Infravermelhos

Tal como foi descrito na secção 1.8.2, a técnica FTIR-ATR permite identificar os grupos químicos predominantes numa amostra. Na Figura 3.5 é possível observar o espectro de FTIR do filme FBQ 1 encontrando-se na Tabela 3.1 a atribuição das principais bandas.

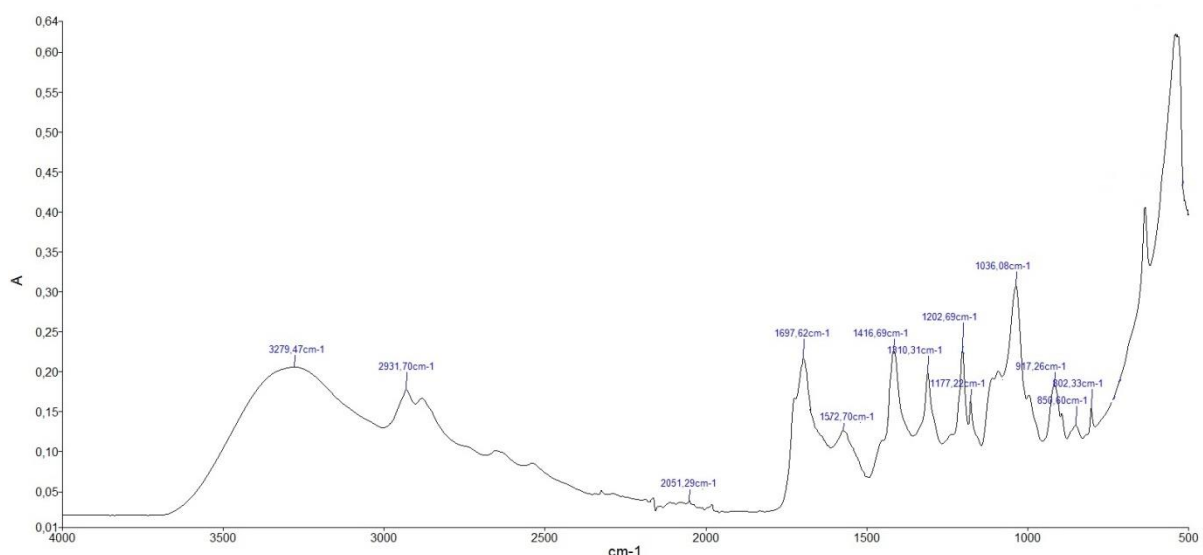


Figura 3.5 - Espectro FTIR-ATR do filme FBQ 1.

Ao observar a Figura 3.5 era de esperar que o espectro mostrasse as bandas características do quitosano (Lawrie *et al.*, 2007). Neste espectro a absorção na região dos 3500-3200 cm^{-1} resulta da sobreposição das bandas devidas ao alongamento dos grupos amina $\nu(\text{N-H})$ e dos grupos hidroxilo $\nu(\text{O-H})$, os picos à volta dos 2931 cm^{-1} são atribuídos à vibração de alongamento das ligações C-H dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, o pico obtido a 1697 cm^{-1} é atribuído à vibração de alongamento do grupo carbonilo dos grupos amida (amida I) ($-\text{CONH}_2$), característico das unidades acetiladas do quitosano, a banda obtida a 1572 cm^{-1} é atribuída à vibração do NH dos grupos amina e amida (amida II), o pico obtido a 1416 cm^{-1} resulta da vibração de deformação dos grupos $-\text{CH}_2$, o pico a 1310 cm^{-1} é atribuído à deformação simétrica dos grupos $-\text{CH}_3$, e os modos vibracionais associados às ligações $\beta(1\rightarrow4)$ -glicosídicas do quitosano $\nu(-\text{O}-)$ e aos grupos $\nu(\text{C-N})$ são caracterizados por bandas na região entre 1177 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 2005). Na Tabela 3.1 estão reunidas todas as atribuições.

Tabela 3.1 - Bandas do FTIR de FBQ 1 com as atribuições.

Vibração (cm ⁻¹)	Atribuição
3279	Elongamento dos grupos O-H e N-H
2931	Elongamento dos grupos C-H
1697	Amida I
1572	Torção dos grupos N-H das aminas e amidas II
1416	Torção dos grupos -CH ₂
1310	Deformação simétrica dos grupos CH ₃
1177 e 1036	Elongamento dos grupos C-O-C e C-N

3.3.3 Termogravimetria

A curva representativa da perda de massa, em percentagem, durante a decomposição térmica é apresentada na Figura 3.6.

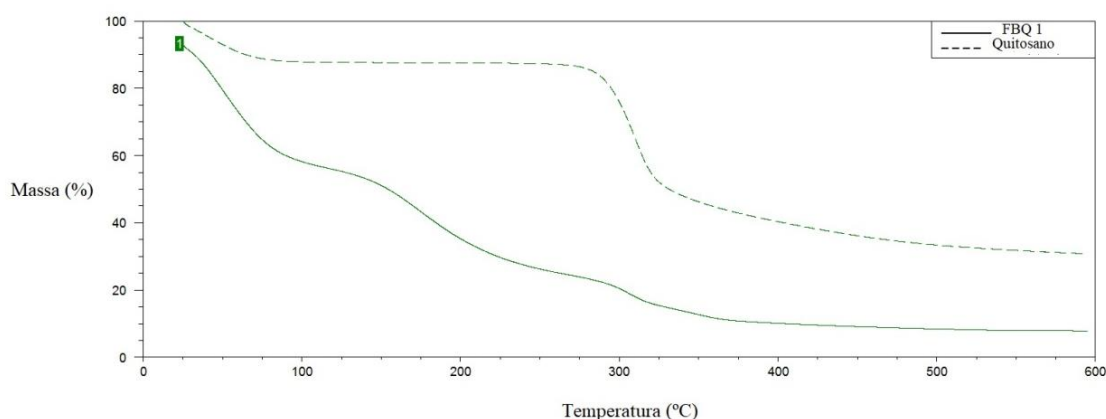


Figura 3.6 - Perfil da perda de massa durante a decomposição térmica de uma amostra de FBQ 1 e quitosano. Linha contínua: curva termogravimétrica de FBQ 1; Linha descontinua: curva termogravimétrica do quitosano em pó.

Por observação da curva termogravimétrica de FBQ 1 verificou-se que esta possui quatro estágios de decomposição: (i) um primeiro estágio, que ocorreu entre os 25 e 76 °C, aproximadamente, com uma perda de massa de próxima dos 18%; (ii) um segundo estágio, compreendido entre os 76 e 220 °C, aproximadamente, com uma perda de massa próxima dos 41%; (iii) um terceiro estágio entre os 220 e 310 °C, aproximadamente, com uma perda de massa de aproximadamente 19%; (iv) um quarto estágio encontra-se entre os 310 e 600 °C, cuja perda de massa foi equivalente a 9%, aproximadamente. No segundo e terceiro estágios (76 a

310 °C) é onde há uma perda de massa superior a metade do seu peso inicial (aproximadamente 60%). A perda de massa nos dois estágios iniciais corresponde à evaporação da água residual presente nas membranas. Por observação da Figura 3.5 é possível ainda verificar que não houve uma perda total da massa da amostra, devido à presença de polissacarídeos que, depois de carbonizados, permanecem, não volatilizando.

Quando comparamos as curvas termogravimétricas do quitosano puro em pó e do filme FBQ 1, podemos observar que, no primeiro estágio de decomposição, a perda de massa é superior em FBQ 1 e que o segundo estágio de decomposição do quitosano abrange os estágios dois e três de FBQ 1. Adicionalmente, entre os 100 e 300 °C, a perda de massa do quitosano é quase nula, enquanto que no caso de FBQ 1, ocorre uma perda de massa considerável. Neste estágio, poderá haver uma perda de resíduos dos outros componentes do filme FBQ 1, por volatilização, uma vez que as temperaturas de ebulição do ácido láctico e de fusão do ácido succínico são de 122 °C e 185 - 188 °C, respetivamente. Ao fim do último estágio, a perda de massa total do quitosano foi inferior à de FBQ 1, o que se deve à menor quantidade de quitosano presente no filme FBQ 1.

3.3.4 Microscopia eletrónica de varrimento

A Figura 3.7 apresentada a seguir permite ver a morfologia da superfície e de uma secção transversal do filme, bem como a presença ou não de poros e a homogeneidade do material formado.

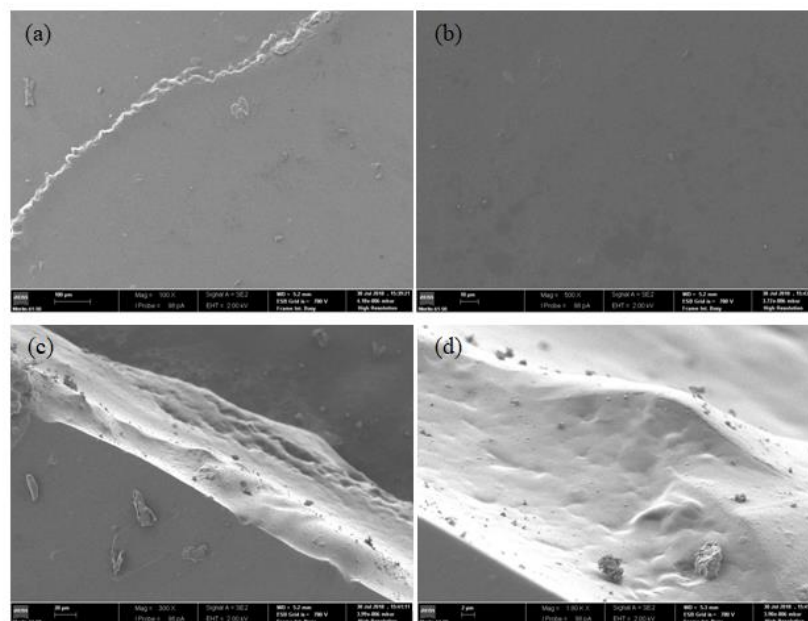


Figura 3.7 - Imagens obtidas por SEM de FBQ 1: (a) e (b) superfície; (c) e (d) secção transversal. (a) e (c) obtidas com uma ampliação de 100x; (b) e (d) obtidas com uma ampliação de 500x. (As partículas que se observam na imagem devem-se à presença de outras amostras, analisadas em simultâneo, na câmara do microscópio).

Na Figura 3.7 é possível observar duas imagens da superfície da amostra com uma ampliação de 100x do lado esquerdo (a), e com 500x do lado direito (b). A morfologia da superfície é plana, lisa e sem irregularidades, o que indica que se obteve um filme homogéneo. A secção transversal também aparenta ser homogénea, simétrica, lisa, sem poros, sem irregularidades e rachaduras. Nomeadamente na Figura 3.6 (c) e (d) é possível observar impurezas na forma de partículas na amostra, que se devem à contaminação da amostra durante a análise por SEM; uma vez que a amostra apresenta uma elevada capacidade de adesão e existiam outras amostras em pó em análise. A contaminação poderá ter ocorrido aquando a preparação das amostras no suporte ou durante o processo de evacuação. Os resultados são concordantes com outros estudos que envolvem filmes à base de quitosano, onde é obtida uma superfície lisa, homogénea e sem irregularidades (Sun *et al.*, 2014; Llanos *et al.*, 2015; Pérez-Córdoba *et al.*, 2018; Riaz *et al.*, 2018).

3.3.5 Goniometria de ângulo de contacto

Esta técnica não permitiu medir o ângulo de contacto e, por isso, não são apresentados resultados. Isto deve-se ao facto de FBQ 1 absorver a gota de PECF em poucos segundos e empolar, isto é, deixou de existir uma superfície plana, necessária para a determinação do

ângulo de contacto. Pelo mesmo motivo, também não foi possível medir o tempo de penetração, da gota. Estes resultados mostram que a gota é rapidamente absorvida por FBQ 1. Este facto é vantajoso para a aplicação pretendida, uma vez que permitirá uma absorção rápida do exsudato.

3.4 Cinética de libertação para o sistema de libertação controlada

3.4.1 Quantificação de fármaco carregado

Para calcular a quantidade de PHMB carregada nos discos para os ensaios de libertação começou por se medir a absorvância da solução de PHMB utilizada para carregamento. Depois de decorrido o processo de carregamento descrito na secção 2.2.2, mediu-se a absorvância da solução após carregamento. Estes valores de absorvância foram convertidos em concentração de PHMB (μg de PHMB/mL de solução) com base na curva de calibração obtida para a PHMB (Figura B.1, do Anexo B) e no fator de diluição. Atendendo ao volume de solução utilizado para o carregamento foi possível calcular a quantidade de PHMB carregada (μg de PHMB). A diferença entre a quantidade antes e após o carregamento dá-nos a quantidade de PHMB carregada (μg de PHMB). A massa de PHMB carregada por massa de disco seco correspondente aos três ensaios de libertação realizados é sumarizada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Massa de PHMB carregada por massa de disco seco correspondente aos três ensaios de libertação.

Ensaio	1	2	3	Média
Massa de PHMB carregada/Massa de disco seco (μg PHMB/mg disco seco)	381	235	253	284 ± 69

A quantidade de fármaco absorvida pelos discos deveria ser aproximadamente a mesma, uma vez que se trata de 3 réplicas. No entanto, verifica-se que o resultado dos discos do Ensaio 1 se distingue dos outros dois. Esse resultado encontra explicação no diferente procedimento de lavagem adotado para os discos do Ensaio 1. Tendo em conta que o 1º processo de lavagem testado (Ensaio 1) não foi eficaz, já que não só foi detetada absorvância a 236 nm, comprimento de onda ao qual se quantifica a PHMB, como também foi possível detetar resíduos lixiviáveis. Testou-se outro método de lavagem nos Ensaios 2 e 3, e como se pode ver na Tabela 3.2, já se obtiveram valores são semelhantes.

Na Tabela 3.3 podemos ver a absorvância da solução de lavagem final dos discos sem fármaco usados como branco e dos discos sem fármaco para carregamento.

Tabela 3.3 - Absorvâncias obtidas após a lavagem dos discos de FBQ 1, para os Ensaios 1, 2 e 3, a 236 nm, para dois discos aleatórios ($n = 2$; SD).

Ensaio	1	2 e 3
Absorvância	0,051	0,014

Como é possível verificar na Tabela 3.3, a solução de lavagem final revelou uma absorvância superior no Ensaio 1, quando comparada com as dos Ensaios 2 e 3, sugerindo uma diminuição de resíduos lixiviáveis na solução de lavagem quando foi aprimorado o processo de lavagem. No entanto, o ideal será proceder à lavagem até que a absorvância da solução de lavagem seja nula.

Na Tabela 3.4 encontramos a percentagem de PHMB carregado em relação ao presente na solução de carregamento.

Tabela 3.4 - Percentagem de PHMB carregado em relação à PHMB presente na solução de carregamento ($n = 3$; SD).

	PHMB _carregada (%)	<i>PHMB_carregada</i> (%)
Ensaio 1	15	
Ensaio 2	9	11 ± 3
Ensaio 3	10	

Podemos verificar que em média, apenas 11% ± 3% do fármaco presente na solução de carregamento, efetivamente entrou para a matriz polimérica do filme.

3.4.2 Perfil de libertação do fármaco

Na Figura 3.8 podemos encontrar representada a curva de libertação obtida, a curva do branco (discos sem fármaco) e a curva de libertação após correção com o branco, para o Ensaio 1 do filme FBQ 1.

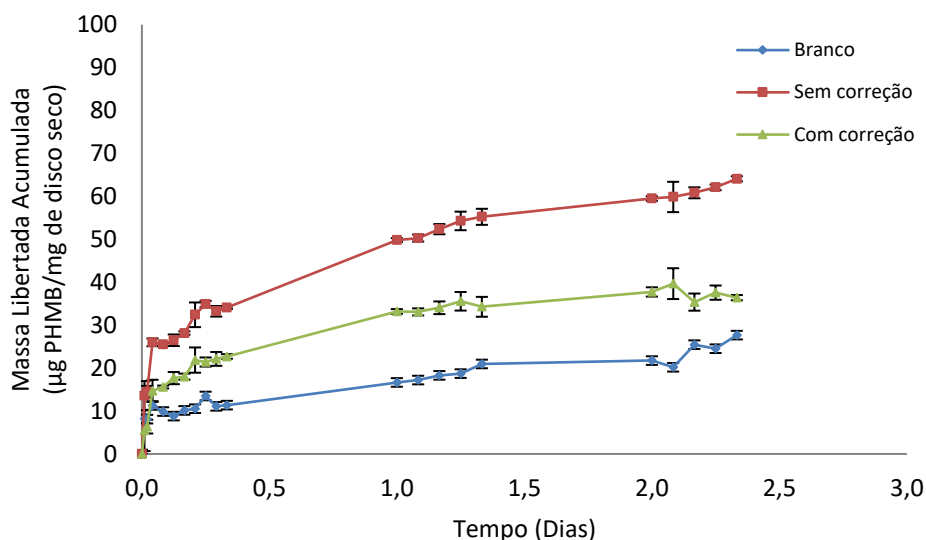


Figura 3.8 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), com as barras de erro (SD; n = 3), para o Ensaio 1 de liberação do filme FBQ 1. Losango azul: curva de discos sem PHMB (branco); quadrado vermelho: curva de liberação não corrigida; triângulo verde: curva de liberação com subtração do branco.

As absorvâncias obtidas para os brancos são elevadas, o que resulta da lavagem insuficiente das amostras e, por isso, durante o ensaio de liberação, no mesmo comprimento de onda utilizado para quantificar a PHMB, são quantificados resíduos lixiviáveis das amostras. Procurou levar-se isto em conta subtraindo a curva do branco à curva do ensaio (Figura 3.8), mas tornou-se claro que seria necessário otimizar o processo de lavagem antes dos ensaios de liberação seguintes. A maioria da PHMB foi libertada nas primeiras ~6 h, no entanto não se atingiu o estado estacionário da liberação (*plateau*), que foi atingido ao fim de 24 h. O equilíbrio foi alcançado quando ~33 µg de PHMB/mg de disco seco foram libertadas. Na Figura 3.9 podemos encontrar representada a curva de liberação obtida, a curva do branco (discos sem fármaco) e a curva de liberação após correção com o branco, para o Ensaio 2 do filme FBQ 1.

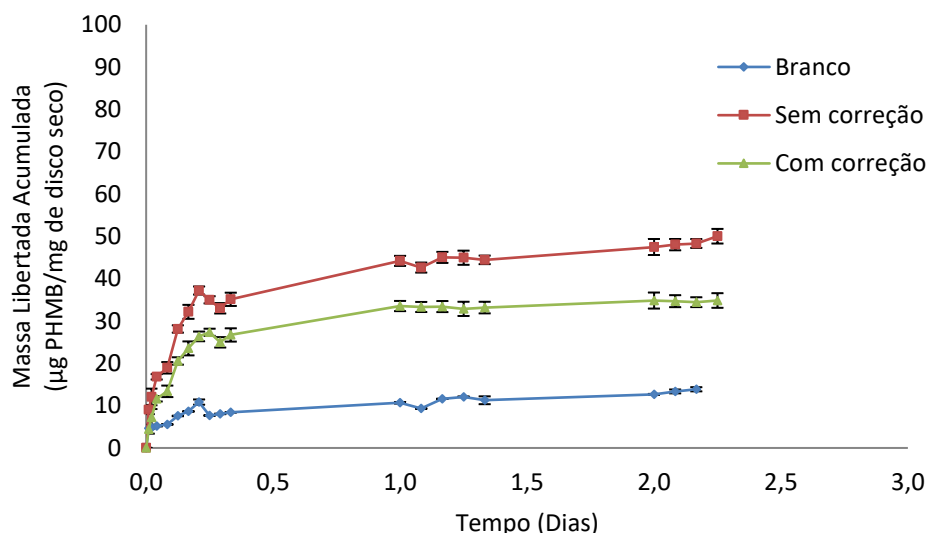


Figura 3.9 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), com as barras de erro (SD; n = 3), para o Ensaio 2 de libertação do filme FBQ 1. Losango azul: curva de discos sem PHMB (branco); quadrado vermelho: curva de libertação não corrigida; triângulo verde: curva de libertação com subtração do branco.

Para o segundo ensaio de libertação, o processo de lavagem foi melhorado, como descrito na secção 2.2.4. É perceptível que as absorvâncias obtidas para o branco neste ensaio são menores quando comparadas com as do Ensaio 1, no entanto seria ideal otimizar o processo de lavagem até que estas sejam nulas, só assim podemos garantir que todos os lixiviáveis que absorvem ao mesmo comprimento de onda utilizado na quantificação da PHMB foram removidos. A maioria da PHMB foi libertada nas primeiras ~8 h, mas o *plateau* foi atingido quando ~33 µg de PHMB/mg de disco seco foram libertadas. As barras de erro (SD) obtidas foram reduzidas, pelo que há uma boa reprodutibilidade no ensaio e na preparação das amostras. Este ensaio foi, ainda, repetido com novas amostras (Ensaio 3) de modo a verificar se se conseguiria obter os mesmos resultados. Na Figura 3.10 podemos encontrar representada a curva de libertação obtida, a curva do branco (discos sem fármaco) e a curva de libertação após correção com o branco, para o Ensaio 3 do filme FBQ 1.

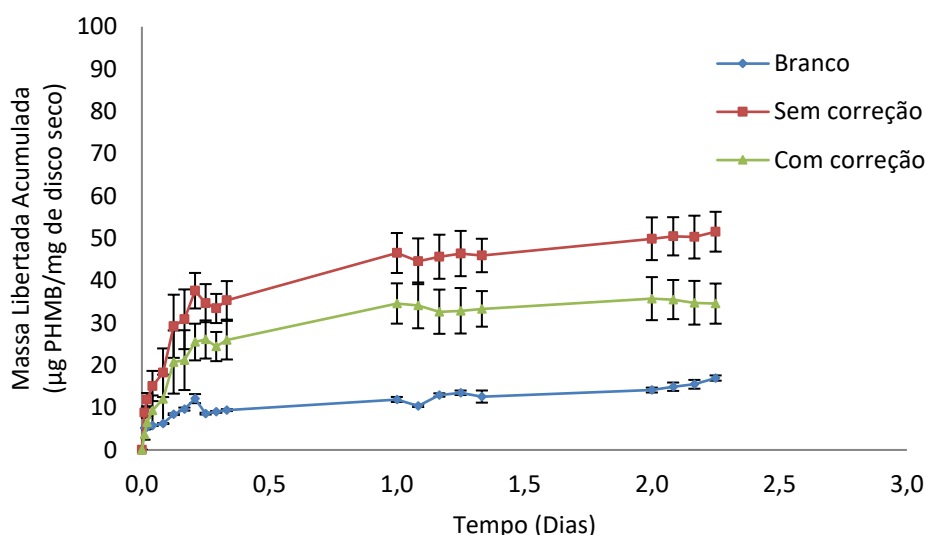


Figura 3.10 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECE, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), com as barras de erro (SD; n = 3), para o Ensaio 3 de libertação do filme FBQ 1. Losango azul: curva de discos sem PHMB (branco); quadrado vermelho: curva de libertação não corrigida; triângulo verde: curva de libertação com subtração do branco.

O processo de lavagem das membranas adotado no Ensaio 3 foi igual ao método utilizado para o Ensaio 2 como referido anteriormente e descrito na secção 2.2.4. Como as condições deste ensaio eram exatamente as do Ensaio 2 e devido à escassez de amostras, utilizou-se a mesma curva de libertação dos discos sem PHMB (branco) do Ensaio 2. A maioria da PHMB foi libertada nas primeiras ~8 h. O equilíbrio atingiu-se quando foram libertadas ~34 µg de PHMB/mg de disco seco. As barras de erro (SD) foram superiores às do Ensaio 2.

De salientar que se verificou a ocorrência de condições “*sink*” em todos os ensaios uma vez que a concentração máxima de PHMB libertada se encontra muito abaixo do limite superior (10x) da solubilidade da PHMB. Também é importante referir que nem o volume (1 mL), nem a taxa de renovação do meio (PECF) (de hora a hora nas primeiras 24 h, e de 2 em 2 horas, até ao término do ensaio) utilizados para os estudos de libertação, são equivalentes ao volume e taxa de renovação de exsudato que ocorrem numa ferida.

Na Figura 3.11 encontram-se representadas as curvas de libertação corrigidas dos 3 ensaios. Verifica-se que as 3 curvas de libertação são coincidentes, pelo que a preparação das amostras e os ensaios de libertação são reprodutíveis.

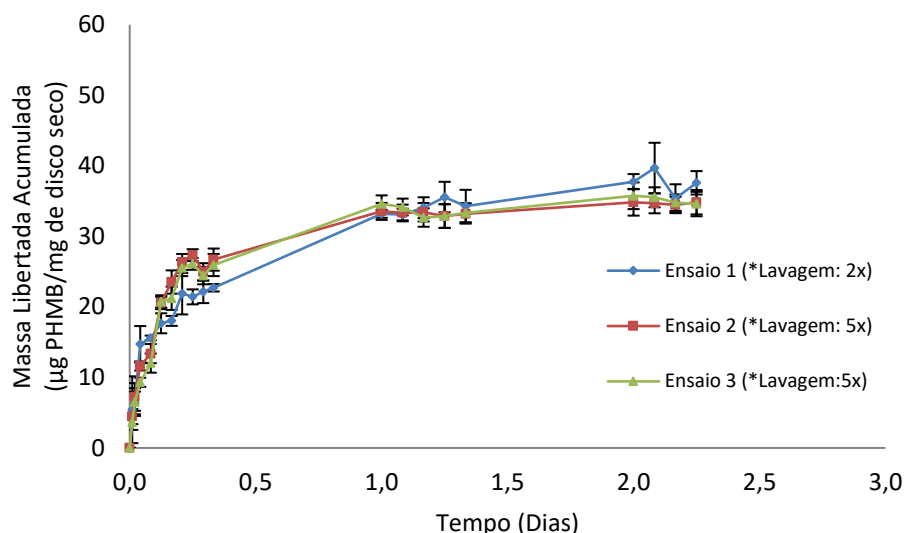


Figura 3.11 - Quantidade acumulada de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm), para os Ensaios 1, 2 e 3 de libertação. Losango azul: curva de libertação corrigida com a subtração do branco para o Ensaio 1; quadrado vermelho: curva de libertação corrigida com a subtração do branco para o Ensaio 2; triângulo verde: curva de libertação corrigida com a subtração do branco para o Ensaio 3. (Nota: o Ensaio 1 não é comparável com os Ensaios 2 e 3 porque o processo de lavagem foi diferente).

Na Tabela 3.5 encontra-se a percentagem de PHMB libertado no *plateau* face à quantidade de fármaco carregado, bem como a concentração de PHMB libertada no equilíbrio e o tempo de duração da libertação, para cada ensaio de libertação.

Tabela 3.5 – Duração da libertação ($t_{\text{libertação}}$), quantidade de PHMB libertada quando se atingiu o equilíbrio ($[\text{PHMB}]_{\text{eq}}$) e percentagem de PHMB libertada no equilíbrio relativamente à PHMB carregada ($\text{PHMB}_{\text{libertada}}$), para cada ensaio ($n = 3$; SD).

Ensaio	$t_{\text{libertação}}$ (dia)	$[\text{PHMB}]_{\text{eq}}$ (μg PHMB/mg disco seco)	PHMB_libertada (%)	$\overline{\text{PHMB}_{\text{libertada}}}$ (%)
1	1	33	13	
2	1	33	14	$13,3 \pm 0,6$
3	1	34	13	

Podemos verificar que em média, apenas $13,3\% \pm 0,6\%$ do fármaco carregado nos discos para o ensaio de libertação de fármaco foi libertado durante o mesmo, tendo a libertação a duração de, aproximadamente, 1 dia.

Na Figura 3.12 está representada a concentração de PHMB no meio de libertação (corrigida com o branco), em função do tempo, de modo a analisar durante quanto tempo é libertado o fármaco acima da MIC da PHMB.

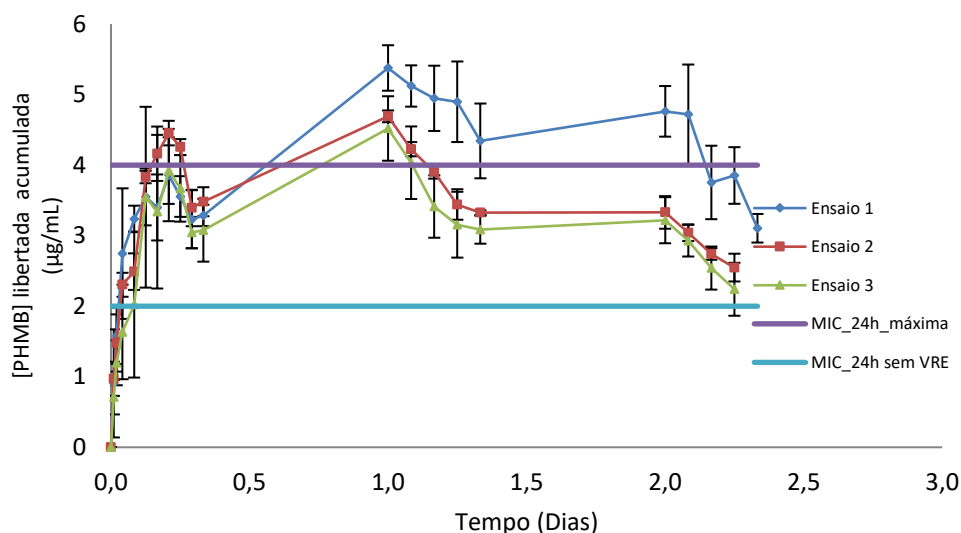


Figura 3.12 - Concentração de PHMB libertada ao longo do tempo em PECF, a 37 °C e sob agitação (100 rpm) e valor da MIC_{24h} e MIC_{24h}-máxima da literatura. Linha azul escuro: concentração de PHMB libertada com subtração do branco para o Ensaio 1; linha vermelha: concentração de PHMB libertada com subtração do branco para o Ensaio 2; linha verde: concentração de PHMB libertada com subtração do branco para o Ensaio 3; linha roxa: valor de MIC máxima ao fim de 24h (ver secção 1.5); linha azul claro: valor de MIC ao fim de 24h sem considerar VRE (ver secção 1.5).

Pela análise da Figura 3.12 é possível verificar que a PHMB foi libertada acima da MIC_{24h} máxima (4 µg/mL) após ~4 h do início para o Ensaio 2 e após ~3 h para o Ensaio 3; o mesmo não acontece para Ensaio 1 que só ao fim de ~13 h passou a libertar acima da MIC_{24h} máxima. No entanto permaneceu sempre acima da MIC_{24h} máxima nas horas seguintes. No entanto, a quantidade de fármaco libertada neste ensaio poderá estar sobrestimada, devido ao elevado nível de substâncias lixiviáveis libertadas pelo filme, apesar de se ter subtraído o branco (discos sem fármaco). A PHMB não é libertada acima da MIC_{48h} máxima (16 µg/mL; Tabela 1.1) em nenhum dos ensaios de libertação, mas, geralmente, os pensos são renovados diariamente. No entanto, a concentração de PHMB libertada encontra-se acima dos valores de MIC para todas as bactérias (2 µg/mL), à exceção de VRE cujo valor da MIC_{24h} é de 4 µg/mL (MIC_{24h} máxima), o que significa que a PHMB libertada é capaz de inibir o crescimento das principais bactérias encontradas em feridas. Todavia, este resultado não é garantia de que o mesmo sucederá *in vivo* já que numa ferida, as condições de libertação são muito diferentes das deste ensaio e, em particular, não deverão ocorrer condições “*sink*”.

A fim de avaliar se houve degradação ou perda de material depois dos ensaios de libertação, os discos, utilizados como branco (B1 – B3), foram colocados na estufa a 50 °C após terem sido usados como branco do ensaio de libertação, para se determinar a sua massa seca. Na

Tabela 3.6 é apresentada a massa dos discos secos antes e depois dos ensaios de libertação e respetivo desvio padrão.

Tabela 3.6 - Massa dos discos secos antes e depois dos ensaios de libertação ($n = 3$; SD).

Ensaio 1	Massa (mg)	
	Antes	Depois
Branco	$2,9 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,5$
Ensaio 2 e 3	Massa (mg)	
	Antes	Depois
Branco	$2,8 \pm 0,7$	4 ± 1

A massa dos discos secos deveria ser igual antes e depois do ensaio de modo a garantir que não houve perda de massa dos discos durante o ensaio de libertação. Para comparar as massas médias antes e depois do ensaio foi feito um teste estatístico de t Student. Foi possível verificar que não existia uma diferença com significado estatístico entre as massa de discos nos estudos de libertação dos 3 ensaios, para um grau de confiança de 95%. Assim, a absorvância que se detetou no branco durante o ensaio de libertação não poderá dever-se à dissolução da amostra.

3.4.3 Estudo da cinética de libertação do fármaco

Os modelos matemáticos utilizados para analisar a cinética de libertação de PHMB nos filmes à base de quitosano foram os seguintes: (i) Ordem Zero; (ii) Primeira Ordem; (iii) Korsmeyer-Peppas; e, (iv) Higuchi (Secção 1.6). Dos resultados de libertação obtidos na Figura 3.11, em nenhum dos casos houve uma variação linear na quantidade de PHMB libertada ao longo do tempo, durante a totalidade do ensaio, pelo que o mecanismo de libertação não é de ordem zero. Nas Figuras 3.13 a 3.15 encontra-se a representação gráfica do ajuste do modelo cinético de ordem zero, revelando a total ausência de correlação.

Em relação ao modelo de primeira ordem, nas Figuras 3.13 a 3.15 encontra-se a linearização deste modelo (gráficos de $\log(M_t/M_{inf})$ em função do tempo t) e é, também, visível o não ajuste aos dados experimentais.

Em relação aos dois modelos restantes (modelo de Korsmeyer-Peppas e Higuchi), nas Figuras 3.13 a 3.15 verifica-se algum ajuste dos modelos aos dados experimentais.

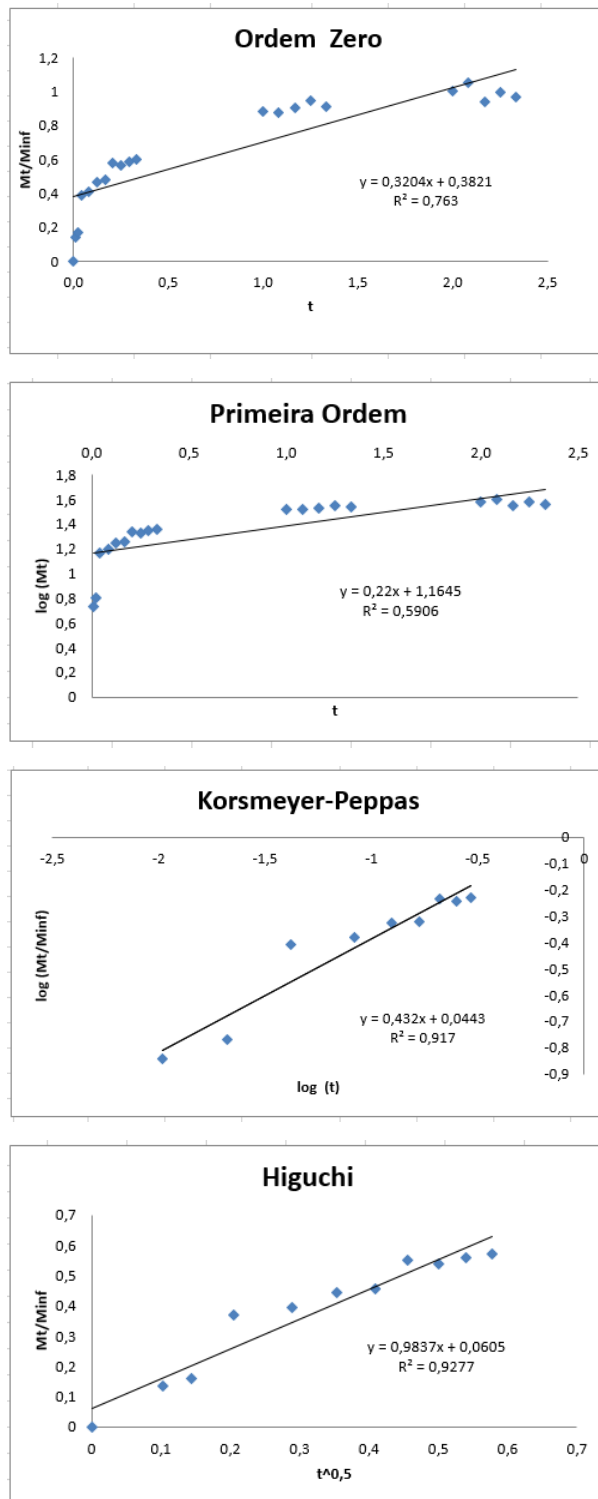


Figura 3.13 - Representação gráfica do ajuste dos modelos cinéticos aos resultados de liberação obtido para FBQ 1 obtidos no Ensaio 1.

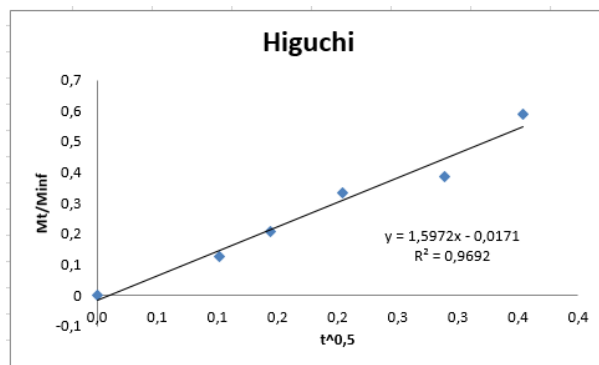
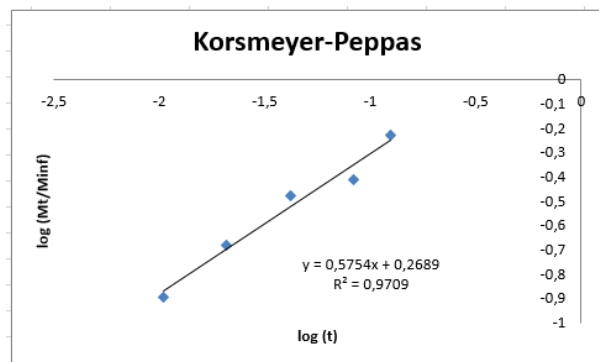
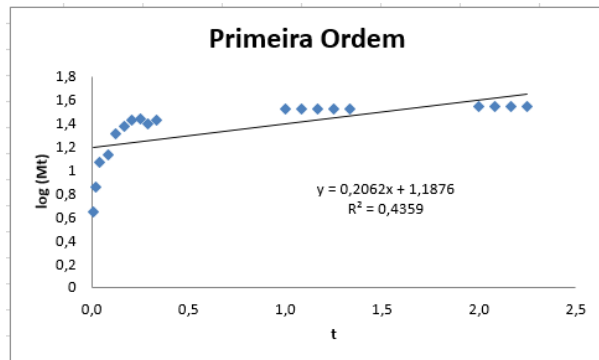
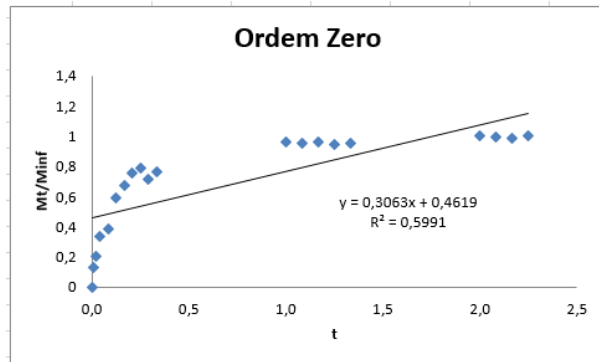


Figura 3.14 - Representação gráfica do ajuste dos modelos cinéticos aos resultados de liberação obtido para FBQ 1 obtidos no Ensaio 2.

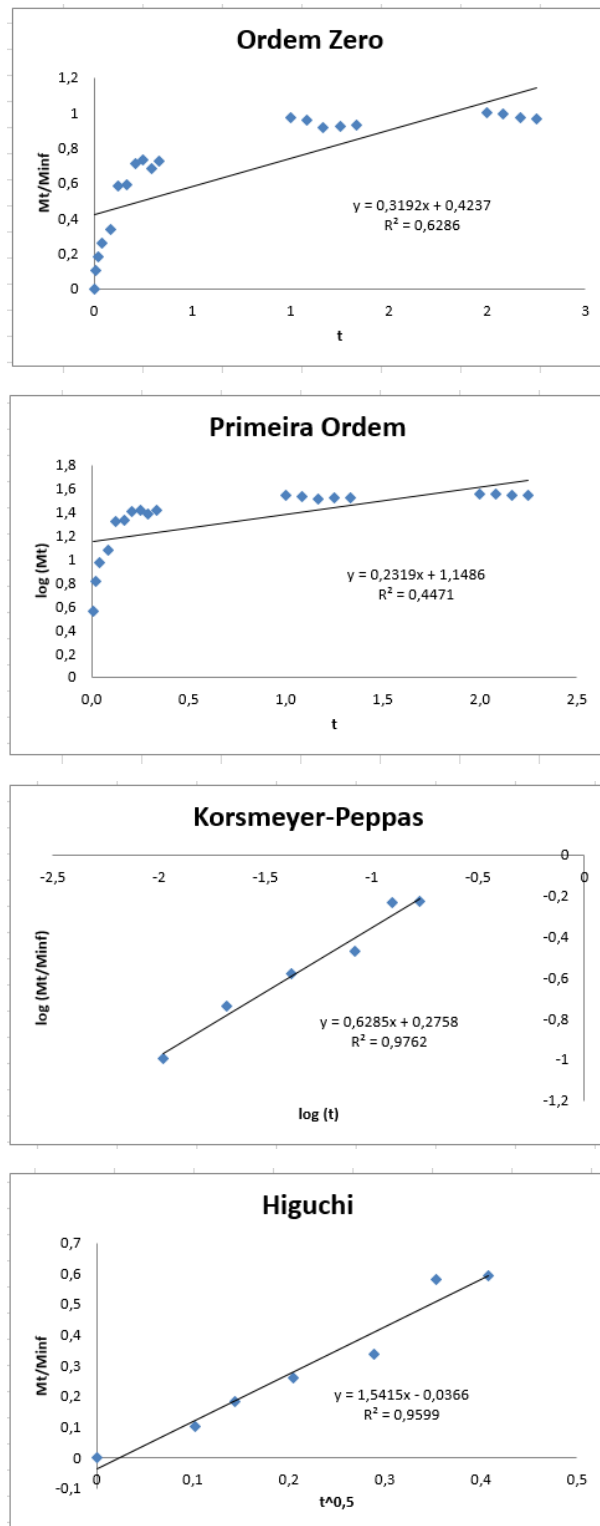


Figura 3.15 - Representação gráfica do ajuste dos modelos cinéticos aos resultados de liberação obtido para FBQ 1 obtidos no Ensaio 3.

A qualidade do ajuste do modelo foi avaliada com base no coeficiente de determinação ajustado (Equação 6), $R_{ajustado}^2$. Foi considerado um ajuste adequado quando se verificar a

seguinte condição: $R_{ajustado}^2 \geq 0,95$. Na Tabela 3.7 estão reunidos os valores obtidos para o coeficiente de determinação ajustado de cada modelo.

Tabela 3.7 - Coeficiente de determinação ajustado médio, $\bar{R}_{ajustado}^2$, obtido para os diferentes modelos de cinética de libertação de PHMB ($n = 3$; SD).

	Ensaio	Modelos			
		Korsmeyer-Peppas	Ordem Zero	Primeira Ordem	Higuchi
$R_{ajustado}^2$	1	0,92	0,76	0,59	0,93
	2	0,97	0,60	0,44	0,97
	3	0,98	0,63	0,45	0,96
$\bar{R}_{ajustado}^2$		$0,96 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,09$	$0,49 \pm 0,08$	$0,95 \pm 0,02$

Pela análise da Tabela 3.7, os modelos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi cumprem a condição de um bom ajuste aos resultados. Além disso, o valor de $R_{ajustado}^2$ para estes dois modelos é semelhante. Este resultado encontra-se de acordo com o facto do valor de n (expoente difusional) calculado usando o modelo de Korsmeyer-Peppas ter dado muito próximo de 0,5 (Tabela 3.8), o que significa que estamos na presença de um processo de difusão Fickiana, que é precisamente o caso tratado no modelo de Higuchi. Assim, torna-se indiferente usar um ou outro destes modelos no cálculo do coeficiente de difusão que se segue.

Tabela 3.8 - Valor do parâmetro n (coeficiente difusional) do modelo de Korsmeyer-Peppas e respetivo tipo de mecanismo de difusão para FBQ 1 ($n = 3$; SD).

Ensaio	1	2	3
n	0,43	0,58	0,63
\bar{n}	$0,5 \pm 0,1$		
Tipo de Mecanismo	Difusão Fickiana		

A partir do valor de n , pode concluir-se que o tipo de transporte característico do mecanismo de libertação da PHMB no FBQ 1 é a difusão Fickiana, o que significa que a taxa de difusão do fármaco é menor que a taxa de relaxamento da matriz polimérica. A partir do modelo de Korsmeyer-Peppas é possível estimar o coeficiente difusional aparente (Equação 4), $D_{aparente}$, com base na constante de libertação, k , obtida a partir do valor da ordenada na origem. A designação de coeficiente difusional aparente deve-se ao facto do mecanismo de difusão não ser puramente Fickiano. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Constante de libertação, k , e coeficiente difusional aparente, $D_{aparente}$, obtidos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas para FBQ 1 ($n = 3$; SD).

Ensaio	1	2	3
$\log(k)$ (d^{-1})	0,04	0,27	0,28
$\log(\bar{k})$ (d^{-1})		$0,2 \pm 0,1$	
\bar{k} (d^{-1})		1,57	
l (mm)	0,21	0,24	0,23
\bar{l}(mm)		$0,23 \pm 0,02$	
$\bar{D}_{aparente}$ (mm^2/d)		25×10^{-3}	

4 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho, foram preparadas diferentes formulações de filmes à base de quitosano e outros polímeros naturais e sintéticos, de forma a obter um sistema de libertação controlada de fármacos, capaz de prolongar o período de tempo de administração do fármaco. Nos filmes à base de quitosano preparados com alginato de sódio (FBQ 1.1) e pectina (FBQ 3 e FBQ 4) não se obtiveram filmes homogêneos. Os filmes FBQ 2, FBQ 2.1, FBQ 2.2 e FBQ 2.3 apresentam na sua constituição o polímero sintético, PEG 600, e o reticulante utilizado foi o glicolal. Estes filmes eram muito rígidos e, por isso adicionou-se o plastificante, glicerol, de modo a torná-las mais maleáveis. No entanto, o glicerol ficou em excesso à superfície do filme. Devido à falta das propriedades desejadas, optou-se por outro método de preparação dos filmes à base de quitosano. Os filmes imersos numa solução de NaOH (1 M), FBQ 5 – FBQ 5.1, apresentavam má maleabilidade. A adição de ácido hialurónico melhorou as propriedades de maleabilidade das membranas (FBQ 7 e FBQ 8), mas quando mergulhadas em água acabaram por se desfazer. Visto que o método de preparação anterior não revelou as propriedades desejadas, usou-se um tratamento com HMDA e cloreto de sebacoílo e outro com PEG e cloreto de sebacoílo a FBQ 8 para tornar os filmes mais resistentes e maleáveis, mas acabaram por se desfazer durante a lavagem necessária antes de iniciar o ensaio de libertação de fármaco. Assim, o melhor filme para estudos de caracterização e incorporação de fármacos foi o filme FBQ 1 (1% AL + 2% Q + 2% AS + 5% GL + 0.5% CMC).

Depois de um primeiro ensaio em que a absorvância dos discos sem fármaco (branco) apresentavam resíduos lixiviáveis no mesmo comprimento de onda a que é absorvida a PHMB (Ensaio 1), aprimorou-se o processo de lavagem para os ensaios seguintes, aumentando o número de renovação da água de lavagem de 2x para 5x (Ensaios 2 e 3). O perfil de libertação para os Ensaio 2 e 3 é muito semelhante, e por isso conclui-se que o ensaio e a preparação das amostras são reprodutíveis. A quantidade de fármaco libertada quando atingido o equilíbrio (*plateau*) foi de ~33-34 µg de PHMB/mg de disco seco.

Foram aplicados os modelos matemáticos para analisar a cinética de libertação de fármaco e identificar o modelo de transporte pelo qual é libertado o fármaco. Conclui-se que o modelo que melhor se ajusta aos perfis de libertação é o modelo de Korsmeyer-Peppas, do qual resulta um valor de expoente difusional ~0,5. Obteve-se, também, um coeficiente de difusão aparente de $25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{d}$.

Tendo em conta todos os resultados obtidos, conclui-se que a quantidade de PHMB carregada não foi muito elevada face à solução de carregamento (11% ± 3%). E, a quantidade

de fármaco libertado face ao carregado também foi de $13,3\% \pm 0,6\%$, no entanto a quantidade libertada é suficiente para inibir o crescimento de microrganismos ao fim de poucas horas (entre 3 a 4 horas), tendo em conta o valor da MIC_{24h} ($2 \mu\text{g/mL}$) característica da maioria das bactérias apresentadas neste trabalho.

Para futuros trabalhos, a fim de avaliar as diferenças que existem no perfil e cinética de libertação, poderia fazer-se um filme com fármaco incorporado por oclusão, mas mantendo todas as outras condições adotadas ao longo deste trabalho. Visto que a membrana selecionada se enrola e se torna frágil quando mergulhada em água, é necessário desenvolver uma membrana compósita que a torne mais resistente quando mergulhada em água sem que esta se enrole, dada a sua aplicação em pensos curativos. A quantidade de fármaco carregada foi muito baixa quando comparada com a quantidade utilizada para o carregamento, por isso se poderá aumentar o tempo do carregamento. Para a aplicação a que se destinam os filmes, outras formulações podem ser testadas. Para a caracterização dos filmes podem ser avaliadas outras propriedades importantes como por exemplo a permeabilidade a vapor de água e citotoxicidade.

Referências

- Agrawal, A.; Purwar, R. (2018) Swelling and drug release kinetics of composite wound dressing. *Indian Journal of Fibre & Textil Research*, 43, 104-111.
- Ahmed, E. M. (2015) Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. *Journal of Advanced Research*, 6, 105-121.
- Ahmed, S.; Ahmad, M.; Jayachandran, M.; Qureshi, M. A.; Ikram, S. (2015) Chitosan based dressings for wound care. *Immunochemistry & Immunopathology*, 1, 1-6.
- Ampawong, S.; Aramwit, P. (2017) A study of a long-term stability and antimicrobial activity of chlorhexidine, polyhexamethylene biguanide, and silver nanoparticles incorporated in sericin-based wound dressing. *Journal of Biomaterials Sciences. Polymer Edition*, 28, 1286-1302.
- Atiyeh, B. S.; Dibo, S. A.; Hayeh, S. N. (2009) Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. *International Wound Journal*, 6, 420-430.
- Barrett, S. (2017) Wound-bed preparation: a vital step in the healing process. *British Journal of Nursing*, 26, s24-s31.
- Bernauer, U.; Coenraads, P. J.; Degen, G.; Dusinska, M.; Lilienblum, W.; Luch, A.; Nielsen, E.; Platzek, T.; Rastogi, S. C.; Rousselle, C.; Benthem, J. van (2015) The safety of poly(hexamethylene) biguanide hydrochloride (PHMB). *Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS/1535/14.
- Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N. E.; Eccleston, G. M. (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 2892-2923.
- Caló, E.; Khutoryanskiy, V. V. (2015) Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267.
- Cammarata, C. R.; Hughes, M. E.; Ofner, C. M. (2015) Carbodiimide induced cross-linking, ligand addition, and degradation in gelation. *Molecular Pharmaceutics*, 12, 783-793.
- Chau, T. T. (2009) A review of techniques for measurement of contact angles and their applicability on mineral surfaces. *Minerals Engineering*, 22, 213-219.
- Chirani, N.; Yahia, L.; Grirsch, L.; Motta, F. L.; Chirani, S.; Faré, S. (2015) History and applications of hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*, 4, 1-23.
- Coimbra, P.; Ferreira, P.; de Sousa, H. C.; Batista, P.; Rodrigues, M. A.; Correia, I. J.; Gil, H. M. (2011) Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan

- polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 112-118.
- Cojocaru, V.; Ranetti, A. E.; Hinescu, L. G.; Ionescu, M.; Cosmescu, C.; Postoarca, A. G.; Cinteza, L. O. (2015) Formulation and evaluation of *in vitro* release kinetics of Na₃CaDTPA decorporation agent embedded in microemulsion-based gel formulation for topical delivery. *Farmacia*, 63, 656-664.
- Crank, J. (1975) *The Mathematics of diffusion*. 2^a Edição, Bristol, Oxford University Press.
- Cremer, L.; Gutierrez, J.; Martinez, J.; Materon, L. A.; Gilkerson, R.; Xu, F.; Lozano, K. (2018) Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications. *Nanomedicine Journal.*, 5, 6-14.
- Dash, S.; Murthy, P. N.; Nath, L.; Chowdhury, P. (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 67, 217-223.
- Eming, S. A.; Martin, P.; Tomic-Canic, M. (2014) Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6, 1-16.
- Epure, V.; Griffon, M.; Pollet, E.; Avérous, L. (2011) Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydrate Polymers*, 83, 947-952.
- European Pharmacopoeia (2008). *Dissolution test for solid dosage forms* (01/2008:20903). Em: European Pharmacopoeia, 6^a edição. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, Council of Europe. Strasbourg.
- Finnegan, S.; Percival, S. L. (2015) Clinical and antibiofilm efficacy of antimicrobial hydrogels. *Advances in Wound Care*, 4, 398-406.
- Gallant-Behm, C. L.; Yin, H. Q.; Liu, S.; Hegggers, J. P.; Langford, R. E.; Olson, M. E.; Hart, D. A.; Burrell, R. E. (2005) Comparison of *in vitro* disc diffusion and time kill-kinetic assays for the evaluation of antimicrobial wound dressing efficacy. *Wound Repair and Regeneration*, 13, 412-421.
- Gibas, I.; Janik, H. (2010) Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. *Chemistry & Chemical Technology*, 4, 297-304.
- Gonzalez, A. C. O.; Costa, T. F.; Andrade, Z. A.; Medrado, A. R. A. P. (2016) Wound healing – a literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91, 614-620.
- Han, G.; Ceilley, R. (2017) Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34, 599-610.

- Hermanson, G. T. (2013) *Bioconjugate techniques*. Parte II- Bioconjugate reagents. 2ª Edição. Academic Press, San Diego, 213-233.
- Hoare, T. R.; Kohane, D. S. (2008) Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer*, 49, 1993-2007.
- Hoffman, A.S. (2012) Hydrogels for biomedical applications. *Advance Drug Delivery Reviews*, 64, 18-23.
- Horcajada, P.; Serre, C.; Vallet-Regi, M.; Sebban, M.; Taulelle, F.; Férey, G. (2006) Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 45, 5974-5978.
- Immergut, E. H.; Mark, H. F. (1965) *Plasticization and plasticizer processes*. Principles of plasticization. American Chemical Society, Washington. Volume 48. Capítulo 1, 1-26.
- Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Kumar, P. T. S.; Nair, S. V.; Tamura, H. (2011) Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29, 322-337.
- Kamath, K. R.; Park, K. (1993) Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11, 59-84.
- Kaushik, K.; Sharma, R. B.; Agarwal, S. (2016) Natural polymers and their applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 37, 30-36.
- Kirker, K. R.; Fisher, S. T.; James, G. A.; McGhee, D.; Shah, C. B. (2009) Efficacy of polyhexamethylene biguanide-containing antimicrobial foam dressing against MRSA relative to standard foam dressing. *Wounds*, 21, 229-233.
- Koburger, T.; Hubner, N. -O.; Braun, M.; Siebert, J; Kramer, A. (2010) Standardized comparasion of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1712-1719.
- Kramer, A.; Dissemond, J.; Kim, S.; Willy, C.; Mayer, D.; Papke, R.; Tuchmann, F.; Assadian, O. (2018) Consensus on wound antisepsis: update 2018. *Skin Pharmacol Physiol*, 31, 28-58.
- Kumar, A. C.; Erothus, H. (2016) Synthetic polymer hydrogels. *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*, 6, 141-162.
- Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grondahl, L. (2007) Interations between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8, 2533-2541.

- Lee, K. Y.; Yuk, S.H. (2007) Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science*, 32, 669-697.
- Lee, S.C.; Know, I. K.; Park, K. (2013) Hydrogels for delivery of bioactive agents: a historical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 17-20.
- Liechty, W. B.; Kryscio, D. R.; Slaughter, B. V.; Peppas, N. A. (2010) Polymers for drug delivery. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, 149-173.
- Lin S. Y.; Chen, K. S; Run-Chu, L. (2001) Design and evolution of drug loaded wound dressing having thermoresponsive, adhesive, absorptive and easy peeling properties. *Biomaterials*, 22, 2999-3004.
- Liu, H.; Wang, C.; Li, C.; Qin, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Li, Z.; Wang, J. (2018) A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *Royal Society of Chemistry*, 8, 7533-7549.
- Llanos, J. H. R.; Vercik, L. C. O.; Vercik, A. (2015) Physical properties of chitosan films obtained after neutralization of polycation by slow drip method. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6, 276-291.
- Lloyd, L.L.; Kennedy, J. F.; Methacanon, P.; Peterson, M.; Knill, C.J. (1998) Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydrate Polymers*, 37, 315-322.
- Mogosanu, G. D.; Grumezescu, A. M. (2014) Natural and synthetic polymers for wound and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 463, 127-136.
- Moura, L. I. F.; Dias, A. M. A.; Carvalho, E.; de Sousa, H. C. (2013) Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - a review. *Acta Biomaterialia*, 9, 7093-7114.
- Novak, K.; Cupp, M. J.; Tracy, T.S. (2003) Chitosan. *Dietary Supplements: Toxicology and Clinical Pharmacology*, Cap. 2, 33-19.
- Nussbaum, S.R.; Carter, M. J.; Fife, C. E.; DaVanzo, J.; Haught, R.; Nusgart, M.; Cartwright, D. (2018) An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. *Value Health*, 21, 27-32.
- Olatunji, O. (2015) Classification of natural polymers. *Natural Polymers*, Cap. 1, 1-17.
- Pachauu, L. (2015) Recent developments in novel drug delivery systems for wound healing. *Expert Opinion Drug Delivery*, 12, 1-15.
- Patrulea, V.; Ostafe, V.; Borchard, G.; Jordan, O. (2015) Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 417-426.

- Paula, G. F. de; Netto, G. I.; Mattoso, L. H. C. (2011) Physical and chemical characterization of poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride. *Polymers*, 3, 928-941.
- Peppas, N. A.; Sahlin, J. J. (1989) A simple equation for description of solute release – III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57, 169-172.
- Pérez-Córdoba, L. J.; Norton, I. T.; Batchelor, H. K.; Gkatzionis, K.; Spyropoulos, F.; Sobra, P. J. A. (2018) Physico-chemical, antimicrobial and antioxidante properties of gelatina-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. *Food Hydrocolloids*, 79, 544-559.
- Prashanth, K. V. H.; Tharanathan, R. N. (2007) Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potencial – an overview. *Food Science & Technology*, 18, 117-131.
- Riaz, A.; Lei, S.; Akhtar, H. M. S.; Wan, P.; Chen, D.; Jabbar, S.; Abid, M.; Hashim, M. M.; Zeng, X. (2018) Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 547-555.
- Ritger, P. L.; Peppas, N. A. (1987) A simple equation for description of solute release - I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5, 23-36.
- Romero, A. I.; Villegas, M.; Cid, A. G.; Parentis, M. L.; Gonzo, E. E.; Bermúdez, J. M. (2018) Validation of kinetic modeling of progesterone release from polymeric membranes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 54-62.
- Santos, J. B.; Porto, S. G.; Suzuki, L. M.; Sostizzo, L. Z.; Antoniazzi, J. L. (2011) *Avaliação e tratamento de feridas: orientações para profissionais de saúde*. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Acedido em 17 de Maio de 2018 no website UFRGS Repositório Digital: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/34755>.
- Savale, S. (2016) *Drug release kinetics*. Acedido em 23 de Agosto de 2018 no website in SlideShare: <https://pt.slideshare.net/sagarsavale1/drug-release-kinetics>.
- Serafica, G.; Mornino, R.; Oster, G. A.; Lentz, K. E.; Koehler, K. P. (2010) *Microbial cellulose wound dressing for treating chronic wounds*, US Patent No 7 704 523 B2.
- Shaikh, H. K.; Kshirsagar, R. V.; Patil, S. G. (2015) Mathematical models for drug release characterization: a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 324-338.
- Shoichet, M. S. (2010) Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules*, 43, 581-591.

- Sibbald, R. G.; Elliott, J. A. (2016) The role of inadine in wound care: a consensus document. *International Wound Journal*, 14, 316-321.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. (2005) *Spectrometric identification of organic compounds*. 7ª Edição, John Wiley & Sons, Inc. United States of America.
- Sonnemann, K. J.; Bement, W. M. (2011) Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 237-263.
- Srinivasa, P. C.; Ramesh, M. N.; Tharanathan, R. N. (2007) Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1113-1122.
- Stashak, T. S.; Farstvedt, E.; Othic A. (2004) Update on wound dressings: indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 3, 148-163.
- Sun, X.; Wang, Z.; Kadouh, H.; Zhou, K. (2014) The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT – Food Science and Technology*, 57, 83-89.
- Suyatma, N. E.; Tighzeri, L.; Copinet, A.; Coma, V. (2005) Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3950-3957.
- Tamura, H.; Furuike, T. (2014) Chitin and chitosan. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*.
- Tan, H.; Marra, K. G. (2010) Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials*, 3, 1746-1767.
- Tazima, M. F. G. S.; Vicente, Y. A. M. V. A.; Moriya, T. (2008) Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina*, 41, 259-264.
- Vig, S. (2010) *Surgical site wounds and suprasorb® X+ PHMB*. Acedido em 25 de Maio de 2018 no website Sematic Scholar: <https://www.semanticscholar.org/paper/Surgical-Site-Wounds-and-Suprasorb%C2%AE-X%2BPHMB-Vig/63f82d8dba05d050313e975430abf99274fba9da>.
- Wichterle, O.; Lim, D. (1960) Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185, 117-118.
- Wojciechowska, P. (2012) The effect of concentration and type of plasticizer on the mechanical properties of cellulose acetate butyrate organic-inorganic hybrids. *Recent Advances in Plasticizers*, 8, 141-164.
- Xu, L.; Huang, Y.; Zhu, Q.; Ye, C. (2015) Chitosan in molecularly-imprinted polymers: current and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 18328-18347.

Yang, Q.; Dou, F.; Liang, B.; Shen, Q. (2005) Studies of cross-linking reaction on chitosan fiber with glyoxal. *Carbohydrate Polymers*, 59, 205-210.

Anexos

Anexo A – Filmes à base de quitosano preparados

Tabela A.1 – Filmes à base de quitosano preparados, respetiva formulação, condições de preparação, características principais e aspeto visual.


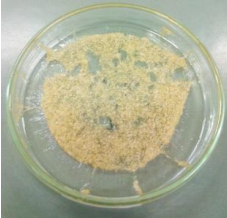
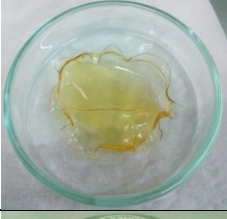

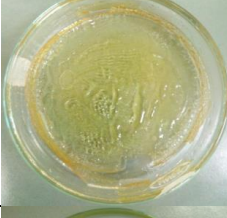
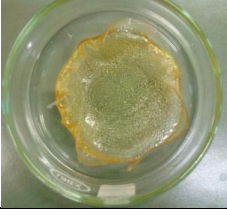
Filmes	Formulação	Condições da reacção	Características finais	Imagem
FBQ 1	AL (1%) + Q (2%) + AS (2%) + Glicerol (5%) + CMC (0.5%)	50°C, 72h	Filme amarelado, mas muito flexível. Boa capacidade de adesão e sem defeitos	
FBQ 1.1	AL (1%) + Q (2%) + AS (2%) + Glicerol (5%) + Alginato (5%) + CMC (0.5%)	50°C, 24h	Filme heterogéneo, duro e resistente, mas pouco flexível	
FBQ 2	AL (1%) + Q (2%) + PEG (2%) + Glioxal (0.5%)	50°C, 24h	Filme amarelado, encolheu de tamanho e ficou filme rígido	
FBQ 2.1	AA (1%) + Q (2%) + PEG (2%) + Glyoxal (0.5%)	50°C, 24h	Filme sem flexibilidade, com uma cor clara	
FBQ 2.2	AL (1%) + Q (2%) + PEG (2%) + Glioxal (0.5%) + Glicerol (5%)	50°C, 24h 75°C, 5h	Filme fino e amarelado, com alguma flexibilidade, mas o glicerol está à superfície do filme	
FBQ 2.3	AL (1% v/v) + Q (2%) + PEG (2%) + Glicerol (2%) + Glioxal (0.5%)	50°C, 24h	Filme amarelado e resistente, mas o glicerol não reage e acaba por ficar na superfície da membrana	

Tabela A.1 – (continuação).

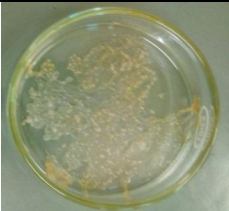




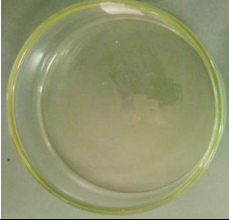
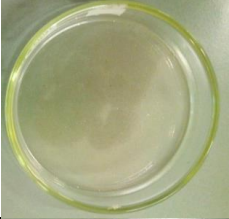
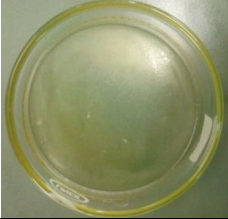
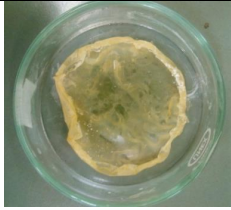
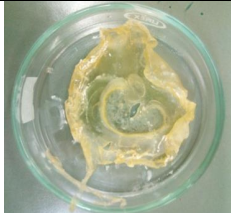
Filmes	Formulação	Condições da reacção	Características finais	Imagem
FBQ 3	AA (1%) + Q (2%) + Pectin (2%)	50°C, 24h	Filme heterogéneo devido à formação do PEC entre o quitosano e a pectina	
FBQ 4	AL (1%) + Q (1%) + Pectina (1%) + Glioxal (0.5%)	50°C, 24h	Filme muito fino, com aglomerados	
FBQ 5	AA (1%) + Q (2%)	50°C, 4h NaOH (1M), 60 min 50°C, 4h	Filme bastante rígido, mas quebra-se com facilidade	
FBQ 5.1	AL (1%) + Q (2%)	50°C, 4h NaOH (1M), 60 min 50°C, 4h	Filme rígido, mas quebra-se com facilidade	
FBQ 5.2	AA (2%) + Q (2%)	50°C, 4h NaOH (1M), 10 min Tambiente, 2 dias	Filmes finos, com uma cor mais clara, frágil e quebradiça	
FBQ 6	AL (1%) + Q (2%) + CMC (1%)	50°C, 24h	Filme extremamente finas, que não dava para remover da caixa de Petri	
FBQ 6.1	AA (1%) + Q (2%) + CMC (1%)	50°C, 24h	Filme extremamente finas, que não dava para remover da caixa de Petri	
FBQ 7	AL (0.67%) + Q (1.33%) + AH (0.05%) + CMC (0.67%)	50°C, 21h	Filme maleável, resistente apesar de muito fino	

Tabela A.1 – (continuação).

Filmes	Formulação	Condições da reacção	Características finais	Imagem
FBQ 8A	AL (0.67%) + Q (1.33%) + AH (0.17%) + CMC (0.67%)	50°C, 48h -HMDA (1%), 2 mL, 5 min -CSeb (1% em toluene), 2 mL, 5 min	Filme homogéneo, com cor amarelada. Resistente e maleável	
FBQ 8B	AL (0.67%) + Q (1.33%) + AH (0.17%) + CMC (0.67%)	50°C, 48h -PEG (1%), 2 mL, 5 min -CSeb (1% em toluene), 2 mL, 5 min	Filme resistente, mas com irregularidades	

Anexo B – Curva de calibração

Na Figura A.1 é apresentada a curva de calibração para a PHMB obtida ajustando os dados experimentais numa reta linear do tipo $y = m \cdot x + b$.

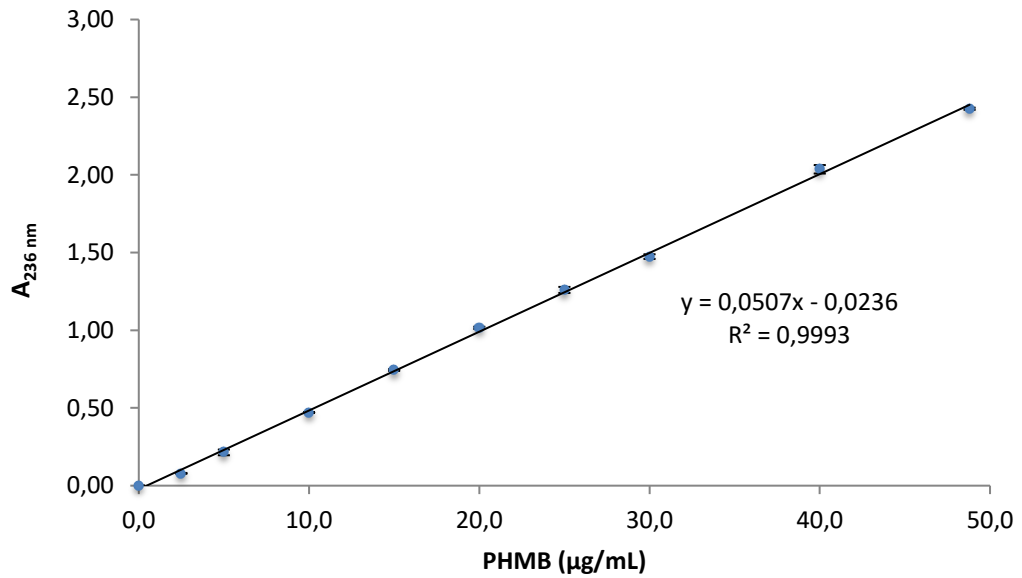


Figura B.1 – Curva de calibração para PHMB em PECF.

Anexo C – Frases de Risco e de Segurança dos principais reagentes utilizados

Tabela C.1 – Frase de risco e de segurança dos compostos químicos perigosos usados ao longo do trabalho.

Composto Químico	No. CAS	Frases de Risco (Frases H)	Frases de Segurança (Frases P)
Acetona	67-64-1	<p>H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis.</p> <p>H319 Provoca irritação ocular grave.</p> <p>H336 Pode provocar sonolência ou vertigens.</p> <p>EUH066 Pode provocar pele seca ou gretada, por exposição repetida.</p>	<p>P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.</p> <p>P240 Ligação à terra/equipotencial do recipiente e do equipamento receptor.</p> <p>P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.</p> <p>P403 + P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.</p>
Ácido acético glacial	64-19-7	<p>H226 Líquido e vapor inflamáveis.</p> <p>H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.</p>	<p>P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.</p> <p>P243 Evitar acumulação de cargas electrostáticas.</p> <p>P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p> <p>P301 + P330 + P331 EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vómito.</p> <p>P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.</p> <p>P308 + P310 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.</p>
Ácido láctico (90%)	79-33-4	<p>H315 Provoca irritação cutânea.</p> <p>H318 Provoca lesões oculares graves.</p>	<p>P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar com sabonete e água abundantes.</p> <p>P332 + P313 Em caso de irritação cutânea: Consulte um médico.</p> <p>P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.</p> <p>P310 Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.</p> <p>P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p>
Ácido succínico	110-15-6	<p>H319 Provoca irritação ocular grave.</p>	<p>P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p> <p>P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.</p>

Tabela C.1 – (continuação).

Composto Químico	No. CAS	Frases de Risco (Frases H)	Frases de Segurança (Frases P)
Cloreto de sebacoílo	111-19-3	H310 Mortal em contacto com a pele	P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis
		H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.	P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/ tomar um duche
		H302 Nocivo por ingestão	P305 +P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P361 Despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. P405 Armazenar em local fechado à chave. P501 Eliminar o conteúdo/ recipiente de acordo com a legislação local/regional/nacional/internacional
Glicerina	56-81-5	H319 Provoca irritação ocular grave.	P305 +P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
Glioxal (40%)	107-22-2	H320 Provoca irritação ocular.	P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
		H315 Provoca irritação cutânea.	P271 Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.
		H332 Nocivo por inalação.	P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis
		H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.	P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.
		H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias.	P273 Evitar a libertação para o ambiente.
		H341 Suspeito de provocar anomalias genéticas.	P202 Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.
H402 Nocivo para a vida aquática	P272 A roupa de trabalho contaminada não deverá sair do local de trabalho. P264 Lavar com sabonete e água cuidadosamente após manuseamento. P308 + P311 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. P303 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): Lavar com sabonete e água abundantes. P332 + P313 Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. P362 + P364 Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.		

Tabela C.1 – (continuação).

Composto Químico	No. CAS	Frases de Risco (Frases H)	Frases de Segurança (Frases P)
Glioxal (40%)	107-22-2		P337 + P311 Caso a irritação ocular persista: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.
HMDA	124-09-4	H312 Nocivo em contacto com a pele. H302 Nocivo por ingestão. H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias. H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.	P280 Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial. P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabonete e água. P301 + P330 + P331 EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito. P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. P308 + P310 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico
Hidróxido de sódio	1310-73-2	H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.	P280 Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial. P301 + P330 + P331 EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito. P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. P308 + P310 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico
PHMB	32289-58-0	H315 Provoca irritação cutânea. H317 Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. H318 Provoca lesões oculares graves. H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias. H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.	P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P273 Evitar a libertação para o ambiente. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabonete e água. P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. P310 Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. P501 Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação nacional P332 + P313 Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. P333 + P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. P362 + P364 Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. P391 Recolher o produto derramado.

Tabela C.1 – (continuação).

Composto Químico	No. CAS	Frases de Risco (Frases H)	Frases de Segurança (Frases P)
Tolueno	108-88-3	<p>H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis.</p> <p>H361d Suspeito de afectar o nascituro.</p> <p>H304 Pode ser mortal por ingestão e penetração nas vias respiratórias.</p> <p>H373 Pode afectar os órgãos.</p> <p>H315 Provoca irritação cutânea.</p> <p>H336 Pode provocar sonolência ou vertigens.</p>	<p>P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.</p> <p>P243 Evitar acumulação de cargas electrostáticas.</p> <p>P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.</p> <p>P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>P202 Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.</p> <p>P301 + P310 EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca.</p> <p>P331 NÃO provocar o vómito.</p> <p>P303 + P361 + P353 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.</p> <p>P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.</p> <p>P308 + P313 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.</p>