



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Miguel Filipe Costa Carmelo

**PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERTAÇÃO
CONTROLADA DE POLIHEXANIDA A PARTIR DE
FILMES DE QUITOSANO**

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

Outubro de 2020

Miguel Filipe Costa Carmelo

Preparação de um Sistema de Libertação Controlada de Polihexanida a partir de Filmes de Quitosano

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

Supervisor (es) / Supervisor (s) :

Dr. António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar
Prof. Dr. Maria Helena Mendes Gil

Instituição:

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



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Coimbra
2020

Financiamento:

Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF), através do financiamento plurianual POCI-01-0145-FEDER-006910, e Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), através do projecto PTDC/CTM-BIO/3640/2014.

Agradecimentos

Queria começar por agradecer aos orientadores deste trabalho, Doutor António Jorge Guiomar e Doutora Maria Helena Gil, pela orientação do trabalho, transmissão de conhecimentos e, em particular, ao Doutor Jorge Guiomar, a ajuda prestada durante a fase laboratorial e na escrita da tese.

À minha família pelo apoio, preocupação e vontade de me ver ser bem-sucedido.

A todos os meus amigos, de Seia e Coimbra, pelos momentos de descontração que me permitiram recuperar forças. Aos meus colegas de casa, com quem vivi ao longo destes anos, e aos quais queria deixar um grande abraço e um desejo de boa sorte. As pessoas a quem gostaria de agradecer em particular são demasiadas para mencionar aqui, mas gostaria de dar um agradecimento especial ao Diogo Salgueiro, Diogo Guerreiro, Ricardo Gameiro, Johnny Baptista, Maria João, Bruno Santos e à Alexandra Albuquerque.

A todos, o meu obrigado!

Resumo

O uso de pensos curativos tem sido cada vez mais comum no tratamento de feridas superficiais, graças à sua eficiência e comodidade para o utilizador. Este tipo de pensos funciona como um sistema de libertação controlada de fármacos e permite uma cicatrização da ferida mais eficaz e rápida, sem haver necessidade de aplicação de antissépticos e trocas de penso frequentes. Neste trabalho foram preparados hidrogéis à base quitosano, na forma de filme, por evaporação do solvente. Estes filmes foram carregados com um agente antisséptico, a polihexanida (poli(hexametileno biguanida); PHMB), de modo a se tornarem um sistema de libertação controlada de PHMB, para uma aplicação como pensos antibacterianos. Foram desenvolvidos filmes a partir de várias formulações, mas apenas um tipo de filme, composto por quitosano reticulado com ácido succínico, com o auxílio de uma carbodiimida, se revelou adequado, sendo caracterizado e avaliado em ensaios de libertação. Estes filmes eram insolúveis, sem perderem coesão quando em água destilada e PBS, possuindo uma capacidade de inchaço em PBS de 1415% e uma espessura média de 0,45 mm quando inchados, sendo permeáveis à PHMB. Um estudo termogravimétrico revelou que, além de não serem grandemente afectados pelas condições de uma esterilização por autoclavagem, os filmes eram termicamente mais estáveis quando carregados com PHMB.

Avaliaram-se três tipos de carregamento da PHMB nestes filmes: por imersão numa solução de PHMB, por imersão numa solução de PHMB em simultâneo com esterilização por autoclavagem e por adição de PHMB à formulação utilizada para preparar os filmes. Com a adição de PHMB à formulação, não se conseguiu obter filmes que não se dissolvessem durante o ensaio de libertação. Quando carregados com PHMB por imersão, partindo-se de filmes pré-inchados, os filmes libertaram 10× mais PHMB do que quando se partiu de filmes secos e se usou metade da concentração de PHMB no carregamento. Já quando o carregamento de filmes pré-inchados foi feito em simultâneo com a sua autoclavagem, a quantidade de PHMB libertada quando se atingiu o equilíbrio não foi grandemente afectada. No entanto, não é claro se a quantidade máxima de PHMB libertada é suficiente para utilizar estes filmes num penso antibacteriano, pois não se pode comparar com o valor da MIC90 deste agente antisséptico para as principais espécies bacterianas presentes em feridas, dado o volume de meio usado nos ensaios ser muito superior ao do exsudato de uma ferida. Por outro lado, a libertação foi sempre de duração demasiado curta (2 a 3 h) para uma aplicação como penso antibacteriano.

Palavras-chave: Hidrogel; Quitosano; Poli(hexametileno biguanida); Libertação controlada de fármacos; Pensos curativos.

Abstract

The use of medicated wound dressings has become increasingly more common in the treatment of superficial wounds, due to their efficiency and convenience for the user. This type of wound dressings works as a controlled drug release system, allowing for a more efficient and faster wound healing process, without the need for frequent rinsing with antiseptics and dressing renewal. In this work, hydrogel films made of chitosan were prepared via solvent evaporation. These films were loaded with an antiseptic, polihexanide (poly(hexamethylene biguanide); PHMB), with the aim of becoming a controlled PHMB release system, for an application as an antibacterial dressing. Films were developed from different formulations, but only one type of film, composed of chitosan crosslinked with succinic acid, with the help of a carbodiimide, was adequate. It was characterized and tested in drug release assays. These films were insoluble, without losing cohesion when immersed in distilled water and PBS, had a swelling capacity of 1415%, an average thickness of 0.45 mm when swollen and were permeable to PHMB. A thermogravimetric analysis revealed that they were not greatly affected by the autoclaving conditions, and were thermally more stable when loaded with PHMB.

Three types of PHMB loading into these films were evaluated: immersion in a PHMB solution, immersion in a PHMB solution simultaneously with autoclaving and addition of PHMB to the formulation used to prepare the films. With the addition of PHMB to the formulation, the obtained films dissolved during the drug release assays. When loaded by immersion in a PHMB solution, the films released 10× more PHMB when using pre-swollen films than when using dry films and half the concentration of PHMB. When the loading of swollen films was done simultaneously with autoclaving, the total amount of PHMB released when at equilibrium was not greatly affected. However, it is not clear if the maximum amount of PHMB released is sufficient to use these films in an antibacterial dressing, since it cannot be compared to the value of MIC₉₀ of PHMB for the most common bacterial species in wounds, because the volume of medium used in the drug release assay was much higher than the volume of wound exudate. On the other hand, the drug release was always too short (2 to 3 h) for an application as antibacterial dressing.

Keywords: Hydrogel; Chitosan; Poly(hexamethylene biguanide); Controlled drug release; Medicated wound dressings.

Índice

Resumo	iii
Abstract.....	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Abreviaturas	xiii
Símbolos.....	xiii
Motivação, Objetivos e Estrutura da Tese.....	1
1. Introdução.....	3
1.1. Feridas	3
1.2. Cicatrização de feridas	3
1.3. Pensos.....	5
1.4. Libertação controlada de fármacos	6
1.5. Pensos curativos	8
1.5.1. Pensos curativos: estado da arte.....	8
1.5.2. Pensos curativos à base de hidrogéis	10
1.5.3. Esterilização de pensos curativos.....	11
1.6. Quitosano	12
1.6.1. Pensos à base de quitosano: estado da arte	17
1.7. Poli(hexametileno biguanida)	18
1.7.1. Pensos que libertam PHMB: estado da arte.....	19
1.8. Caracterização dos filmes.....	21
1.8.1. Lavagem, capacidade de inchaço e espessura.....	21
1.8.2. Análise Termogravimétrica	21
1.8.3. Permeabilidade à PHMB	22
1.9. Caracterização da libertação de PHMB	25
2. Materiais e Métodos	27
2.1. Preparação de filmes à base de quitosano	27
2.1.1. Filmes de quitosano reticulado com ácido succínico e uma carbodiimida.....	27
2.1.2. Filmes de quitosano e alginato.....	28
2.1. Avaliação da solubilidade dos filmes.....	29
2.2. Determinação da capacidade de inchaço dos filmes	30
2.3. Determinação da espessura dos filmes.....	30
2.4. Análise termogravimétrica dos filmes.....	30
2.5. Permeabilidade dos filmes à PHMB	30
2.6. Quantificação da PHMB	32
2.7. Carregamento de PHMB nos filmes	32
2.7.1. Carregamento por imersão	32
2.7.2. Carregamento por adição à formulação	33
2.8. Caracterização da libertação de PHMB	33
2.9. Análise estatística.....	34
3. Resultados e Discussão.....	35
3.1. Preparação de filmes à base de quitosano	35
3.1.1. Filmes de quitosano reticulado com ácido succínico e uma carbodiimida.....	35
3.1.2. Filmes de quitosano e alginato.....	44
3.2. Permeabilidade dos filmes à PHMB	45
3.3. Carregamento e libertação de PHMB.....	47
3.3.1. Carregamento de PHMB em filmes WD9.1 por imersão	47
3.3.2. Carregamento de PHMB em filmes WD9.1 por imersão e autoclavagem	48
3.3.3. Análise termogravimétrica dos filmes autoclavados	49

3.3.4. Carregamento de PHMB por adição à formulação WD9.1	51
3.3.5. Caracterização da libertação de PHMB.....	54
4. Conclusões e Perspetivas Futuras	59
Referências.....	63
Anexos	73
Anexo I Curva de calibração de PHMB	74
Anexo II Transições presentes em termogramas de TGA e DTG de quitosano encontrados na literatura	75

Lista de Figuras

- Figura 1.1** – Perfis de concentração de fármaco na zona alvo quando este é administrado de forma periódica, a cada 8 h (linha fina) e quando este é libertado a partir de um sistema de libertação controlada de um fármaco (linha a tracejado).6
- Figura 1.2** – Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de libertação controlada de fármacos. (i) emulsão ou microemulsão, (ii) invólucros poliméricos, (iii) hidrogéis, (iv) lipossomas. 7
- Figura 1.3** – Representação esquemática das diferentes formas de libertação controlada de fármacos. (i) sistemas activados pelo solvente, (ii) sistemas biodegradáveis, (iii) sistemas com resposta inteligente, (iv) sistemas controlados por difusão. 7
- Figura 1.4** – Formas de preparação de um sistema de libertação controlada a partir de um hidrogel na forma de filme: (i) imersão do filme numa solução de fármaco, (ii) adição do fármaco à formulação do filme. 9
- Figura 1.5** – Estrutura molecular da quitina e do quitosano. 13
- Figura 1.6** – Esquema do conjunto de reações que ocorrem na reticulação do CS por um ácido carboxílico com a ajuda de uma carbodiimida. 15
- Figura 1.7** – Representação esquemática de cadeias poliméricas de CS reticuladas por SA na presença de uma carbodiimida. 15
- Figura 1.8** – Estrutura da PHMB (i) e do seu sal hidrocloreto (ii). 18
- Figura 1.9** – Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz. 23
- Figura 1.10** - Representação esquemática da difusão em estado estacionário de uma substância através de um filme de espessura h , do lado que se encontra com concentração mais elevada (C_d) para o lado de concentração mais baixa (C_r). 23
- Figura 1.11** - Representação esquemática da difusão em estado estacionário de uma substância através de um filme de espessura h , com maior afinidade para a substância ($K > 1$) do lado com concentração de meio mais elevada (C_d) para o lado de concentração de meio mais baixa (C_r). 24
- Figura 2.1** – Blister de 2 cm de diâmetro (esquerda) e base da caixa de Petri com 5 cm de diâmetro (direita). 27
- Figura 2.2** – Esquema do modo como a célula de difusão de Franz foi utilizada nos ensaios de permeabilidade à PHMB de discos WD9.1. 31
- Figura 2.3** – Esquema do modo como a célula de difusão de Franz foi utilizada nos ensaios de libertação de PHMB a partir de discos WD9.1. 34
- Figura 3.1** – Filmes à base de CS da formulação WD9.1, tal como obtido (i), cortado na forma de disco (ii) e lavado e inchado (iii). 35
- Figura 3.2** – Equilíbrio entre a unidade terminal de *N*-acetilglucosamina na forma de anel fechado e na forma de anel aberto e esquema da reação de *Maillard* que origina pigmentos melanóides de cor castanha a partir da unidade terminal de *N*-acetilglucosamina na forma de anel aberto. 36
- Figura 3.3** – Discos de 2 cm de diâmetro cortados a partir dos filmes de CS obtidos com a formulação WD9.1 (i) e com a formulação WD9.1a (ii). 37
- Figura 3.4** – Espectro de absorção dos reagentes utilizados na preparação dos filmes WD9.1, dissolvidos em água destilada (com exceção de CS, que foi dissolvido em LA a 1% (v/v)) e de uma amostra de meio de lavagem retirada após 2 h de lavagem em 50 mL de NaCl 0,9%, a 50 °C (diluída 4×, de modo a não exceder o limite máximo de absorvância do espectrofotómetro). 38
- Figura 3.5** – Sequência de espectros das amostras recolhidas ao longo do antigo (i) e do novo (ii) protocolos de lavagem dos discos, com indicação das alterações feitas na solução utilizada como meio de lavagem e seu volume, temperatura e agitação. 40

- Figura 3.6** – Variação da absorvância a 236 nm de amostras retiradas em cada etapa do processo de lavagem de discos WD9.1 seguindo o antigo (i) e o novo (ii) protocolo de lavagem, com indicação dos diferentes meios (NaCl 0,9% e PBS), volumes e temperaturas. No gráfico (ii), nas 2 últimas colunas, encontra-se representada a variação típica da absorvância a 236 nm de amostras de PBS (branco) que ocorreu durante a medição das absorvâncias representadas em ambos os gráficos. As colunas inexistentes (gráfico (ii), coluna 3 e 9) devem-se a $A_{236} = 0$ 41
- Figura 3.7** – Variação do diâmetro dos discos WD9.1 no final de cada etapa do processo de lavagem dos discos usados nos testes de permeabilidade (i) e nos ensaios de libertação (ii), com diferentes volumes de NaCl a 0,9% e PBS e a diferentes temperaturas. 42
- Figura 3.8** – Massa de PHMB acumulada que atravessou o disco de CS ao longo do tempo, a 34 °C, numa célula de Franz de 14,5 mL, utilizando uma solução de 5 mg/mL de PHMB em PBS (n = 2) e uma solução de 10 mg/mL de PHMB em PBS (n = 3). As linhas representam a regressão linear feita com os pontos na fase linear inicial (estado estacionário). As barras de erro representam o desvio padrão de cada ponto. O gráfico menor é uma ampliação da 1.^a hora do ensaio que permite melhor visualizar o t_L de ambos os estudos..... 46
- Figura 3.9** – Fotografias de discos WD9.1 após a autoclavagem. 1- Disco não autoclavado e mantido à temperatura ambiente. 2- Disco autoclavado a seco. 3- Disco autoclavado imerso em PBS. 4- Disco autoclavado imerso numa solução de PHMB em PBS. 48
- Figura 3.10** – Termogramas de TGA (linhas contínuas) e de DTG (linhas a ponteadas) de filmes WD9.1 não esterilizados, esterilizados em PBS e esterilizados numa solução de 10 mg/mL de PHMB em PBS. 49
- Figura 3.11** – Massa de PHMB libertada pelo disco de CS e acumulada ao longo do tempo, numa célula de Franz com PBS a pH 7,4 e a 34 °C, com um carregamento feito com discos secos, por imersão numa solução de 5 mg/mL de PHMB em PBS (n = 2), durante 24 h, a 34 °C, sob agitação (i), e comparação entre a curva representada em (i) e a curva de libertação de discos pré-inchados em PBS e carregados por imersão numa solução de 10 mg/mL de PHMB em PBS durante 24 h, a 34 °C e sob agitação (n = 2) (ii). As barras de erro representam o desvio padrão de cada ponto. 54
- Figura 3.12** – Massa de PHMB libertada e acumulada pelo disco de CS ao longo do tempo, a 34 °C, numa célula de Franz com 14,5 mL de PBS, utilizando discos não autoclavados (n = 2, linha a tracejado), discos carregados com PHMB a 10 mg/mL em PBS durante a autoclavagem e durante 24 h à T_{amb} (n = 3; linha a ponteadas) e discos não carregados e não autoclavados (branco; n = 2; linha contínua). As barras de erro representam o desvio padrão de cada ponto. 56
- Figura AI.1** – Curva de calibração de PHMB, que relaciona a absorvância a 236 nm com a concentração de PHMB (mg/mL de PBS) na gama 2-30 µg/mL (n = 3; barras de erro: desvio padrão – não visíveis dado a sua dimensão reduzida.74

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Exemplos de pensos disponíveis comercialmente que libertam fármacos, utilizados para tratamento de feridas superficiais.....	9
Tabela 1.2 – Pensos comerciais e não comerciais para tratamento de feridas superficiais, à base de CS, sua composição, forma física e características.	17
Tabela 1.3 – Pensos comerciais e não comerciais que libertam PHMB para tratamento de feridas superficiais, sua composição, forma física e características.	20
Tabela 2.1 – Concentração de cada componente da formulação WD9.1.	27
Tabela 2.2 – Constituição das formulações WD9.1 e WD9.1a.	28
Tabela 2.3 – Protocolos de lavagem para os discos utilizados nos ensaios de permeabilidade (diâmetro: 2,3 cm) e nos ensaios de libertação (diâmetro: 1,65 cm). T_{amb} : temperatura ambiente.....	29
Tabela 2.4 – Composição das formulações de CS e ALG.....	29
Tabela 2.5 – Composição, concentração e momento de adição de PHMB nas formulações WD9.1 às quais foi adicionada PHMB.	33
Tabela 3.1 – Características dos filmes WD9.1 e WD9.1a após retirada do respetivo molde, sua solubilidade em água destilada e em PBS, capacidade de inchaço em PBS e espessura após retirada do molde (secos) e inchados em PBS.....	36
Tabela 3.2 – Variação do diâmetro de discos de filmes da formulação WD9.1 após serem colocados em água destilada (T_{amb}) e PBS (34 °C).	38
Tabela 3.3 – Avaliação da reprodutibilidade da espessura de 2 ou 3 discos de 1,65 e 2,3 cm de diâmetro, lavados e inchados, cortados a partir de 5 discos de 5 cm de diâmetro também lavados e inchados (grupos I a V).	43
Tabela 3.4 – Comparação da espessura de discos lavados e inchados e carregados com PHMB em PBS e discos lavados e inchados em PBS.....	43
Tabela 3.5 – Comparação da espessura de discos carregados com PHMB e autoclavados com a espessura de discos carregados com PHMB mas não autoclavados.	43
Tabela 3.6 – Resultados da preparação de filmes de CS contendo ALG na formulação (a composição das formulações encontra-se na Tabela 2.4).	44
Tabela 3.7 – Fluxo no estado estacionário (J_{ss}), coeficiente de permeabilidade (P), tempo de latência (t_l) e coeficiente de difusão (D) de PHMB através do disco, obtidos nos ensaios de permeabilidade com soluções de PHMB de 5 e 10 mg/mL em PBS.	46
Tabela 3.8 – Massa carregada e rendimento de carregamento de PHMB nos discos WD9.1, por imersão numa solução de 5 mg de PHMB/mL de PBS, durante 24 h a 34 °C, sob agitação a 100 rpm.	47
Tabela 3.9 – Temperatura inicial da transição principal (T_2^i), temperatura final da transição principal (T_2^f), temperatura da perda máxima de massa (T_2^{max}), percentagem de massa perdida na transição principal e percentagem de massa total perdida, identificadas na análise por TGA/DTG de filmes WD9.1 não esterilizados, esterilizados em PBS e autoclavados em PBS ou numa solução de PHMB em PBS.	50
Tabela 3.10 – Características de filmes com PHMB na formulação, após retirada do respetivo molde.....	52
Tabela AII.1 – Intervalo de temperatura da primeira (T_1) e da segunda (T_2 , a principal) transições, temperatura da taxa máxima de perda de massa da transição principal (T_2^{max}) e percentagem de perda de massa total, obtidas em estudos por TGA de CS na forma de pó e na forma de filme.....	75

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Abreviaturas

AA – Ácido acético
ALG – Alginato
CI – Capacidade de inchaço
CMC – *N*-ciclohexil-*N'*-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-*p*-toluenossulfonato
CS – Quitosano
DD – Grau de desacetilação
DTG – Termogravimetria Diferencial
EGF – Fator de crescimento epidérmico
GLY – Glicerol
LA – Ácido láctico
MIC – Concentração Inibitória Mínima
MIC90 – Concentração mínima de uma substância para inibir o crescimento dos microrganismos em 90%
PBS – Solução salina tamponada com fosfato a pH 7,4
PHMB – Poli(hexametileno biguadina) ou polihexanida
PVC – Poli(cloreto de vinilo)
SA – Ácido succínico
TGA – Análise Termogravimétrica

Símbolos

A_{236} – Absorvância a 236 nm
 C – Concentração de PHMB na câmara dadora da célula de Franz
 C_1 – Concentração de PHMB do lado do filme em contacto com a solução dadora
 C_2 – Concentração de PHMB do lado do filme em contacto com a solução receptora
 C_d – Concentração de PHMB da solução dadora
 C_r – Concentração de PHMB da solução receptora
 D – Coeficiente de difusão
 h – Espessura dos filmes
 K – Coeficiente de partição
 J_{SS} – Fluxo de PHMB que atravessa um filme de CS em estado estacionário
 M – Massa de PHMB que atravessa um filme
 m_I – Massa dos filmes inchados em PBS
 m_S – Massa seca dos filmes
 n_s – Diferença não significativa
 P – Coeficiente de permeabilidade
 t – Tempo
 T_1 – Intervalo de temperaturas da primeira transição na curva de TGA
 T_2 – Intervalo de temperaturas da segunda transição (principal) na curva de TGA
 T_2^f – Temperatura final da transição principal na curva de TGA
 T_2^i – Temperatura inicial da transição principal na curva de TGA
 T_2^{\max} – Temperatura de perda máxima de massa na curva de TGA/DTG
 T_{amb} – Temperatura ambiente
 t_L – Tempo de latência
 S – área de superfície do filme atravessado pela PHMB
 x – distância percorrida pela PHMB para atravessar o filme

Motivação, Objetivos e Estrutura da Tese

Vários microrganismos vivem à superfície da pele, mas, em geral, não constituem um problema para saúde. No entanto, se a pele sofrer algum tipo de lesão, como um corte, os microrganismos que se encontrem na pele ou no objeto que provocou a lesão podem causar uma infecção. A gravidade desta infecção depende da zona onde ocorreu o corte, da sua profundidade e do tipo de microrganismos presentes na ferida. Em alguns casos, o sistema imunitário consegue lidar com a infecção. No entanto, noutros casos, pode ser necessário tratar a ferida e, em situações mais graves, pode ser necessário intervenção médica. Uma infecção grave pode causar dor, febre, retenção de líquidos nos tecidos, manchas ou rubor da pele e endurecimento da pele. Em certos casos, pode levar ao internamento do doente, a intervenções cirúrgicas e pode até levar à morte em situações mais críticas. Além disso, o seu tratamento acarreta custos elevados para o sistema de saúde e para o próprio doente.

É muito importante que o tratamento e contenção da infecção seja feito logo a seguir à ocorrência da mesma, de modo a impedir a proliferação de microrganismos na ferida. Nos últimos anos, o mercado de tratamento de feridas tem-se desviado do tratamento feito por especialistas da área, como era o caso antigamente, e tem-se direcionado para um tratamento simples, rápido e de qualidade, que possa ser feito pelo próprio doente. Tem-se assistido, também cada vez mais, à substituição de pensos que atuem meramente como barreiras físicas entre a ferida e o ambiente exterior, por pensos que sejam também capazes de manter a ferida húmida e que sejam capazes de libertar um antibiótico a uma taxa constante diretamente sobre a ferida (pensos curativos).¹

O aumento da ocorrência de feridas cirúrgicas e crónicas é um problema cada vez mais prevalente e que tem impulsionado o mercado de tratamento de feridas e, em particular, o mercado de pensos curativos.²⁻⁴ O aumento da ocorrência de condições como obesidade e diabetes, o aumento da percentagem da população idosa e o aumento dos custos para o setor da saúde, fazem com que o tratamento de feridas crónicas se possa tornar num problema cada vez mais presente face à maior tendência deste tipo de feridas ocorrerem entre a população idosa e/ou com condições de saúde deficitárias pré-existentes.² Na União Europeia, é previsto que a percentagem da população com 65 anos ou mais aumente de 29,6% em 2016 para 51,2% em 2070 relativamente à população que tem entre 15 e 64 anos.⁵ Em 2017, havia 427 milhões de adultos com diabetes, 58 milhões dos quais na Europa, sendo previsto que, em 2045, haja 629 milhões de pessoas a sofrer deste problema. Em 2014, foi reportado que 58% da população da União Europeia sofria de obesidade.^{6,7} A prevalência destes problemas aumenta a necessidade da população em aceder a uma forma de tratamento que permita que a cicatrização de feridas

ocorra de forma mais rápida e eficaz, diminuindo os custos para os sistemas de saúde e diminuindo o recurso a amputações nas situações mais graves.² É previsto que o mercado global do tratamento de feridas cresça 4,6%, de 19,8 mil milhões de dólares em 2019 até 24,8 mil milhões de dólares em 2024.⁴ Um dos subsetores deste mercado que mais tem evoluído nos últimos tempos é o mercado de pensos curativos, que é previsto crescer de 7 mil milhões de dólares em 2020 para 11,2 mil milhões de dólares em 2025³ e que inclui pensos curativos à base de quitosano,⁸ o material utilizado neste trabalho. Graças a este aumento do uso de quitosano como base para pensos curativos, têm-se multiplicado o número de estudos neste âmbito, ao longo dos últimos anos.⁸

O interesse em usar quitosano no fabrico de pensos curativos provém da sua biocompatibilidade, das suas propriedades antibacterianas, da sua hidrofílicidade e do seu potencial para formar uma rede reticulada tridimensional. Esta rede tridimensional pode reter um fármaco antibacteriano, que pode ser libertado sobre a ferida, ajudando assim a conter a propagação e multiplicação de microrganismos na ferida, garantindo que esta mantenha um ambiente húmido que facilite na sua cicatrização e podendo, ainda, absorver excesso de exsudato que seja produzido.

Posto isto, o objetivo deste trabalho é a obtenção de um hidrogel feito à base de quitosano, na forma de filme, para uma aplicação como penso curativo para feridas superficiais, que seja capaz de libertar um agente antibacteriano já utilizado na desinfecção de feridas, a poli(hexametileno biguadina) (PHMB), também designada polihexanida.

Esta dissertação encontra-se organizada em quatro capítulos. No primeiro capítulo, começa-se por definir o que é uma ferida, a sua fisiologia, formas de classificação e apresenta-se o processo de cicatrização. De seguida, é explicado o conceito de penso curativo e as vantagens do seu uso. É, depois, apresentado o tipo de penso desenvolvido neste trabalho e o material que o compõe, bem como o agente antimicrobiano escolhido para incorporar no filme a ser usado como penso e como pode ser adicionado ao filme. No final desta parte introdutória, é apresentada a caracterização do filme preparado. Ao longo do capítulo, é feita uma apresentação do estado da arte, dividida em 3 partes: estado da arte de (i) pensos curativos, (ii) pensos à base de quitosano e (iii) pensos curativos que libertam PHMB. No segundo capítulo, é feita uma descrição dos métodos e materiais utilizados neste trabalho, sendo descritos os processos de obtenção e caracterização dos filmes. No terceiro capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos na preparação e caracterização de filmes e nos ensaios de libertação de PHMB. Finalmente, no quarto capítulo, são apresentadas as conclusões que se tiraram deste trabalho e as perspectivas para a sua continuação.

1. Introdução

1.1. Feridas

Feridas podem ser definidas como uma quebra na estrutura e funcionamento anatómico normal,⁹ que podem envolver o rasgo de uma membrana como a pele ou cortes na superfície de órgãos.⁹⁻¹¹ Podem ser causadas por danos mecânicos externos, como cortes provocados por acidentes ou cirurgias, por queimadura, causada por contacto com fontes de calor extremo, agentes químicos, radiação ou electricidade, ou como resultado de uma condição patológica.^{10,12}

As feridas podem ser divididas em agudas, subagudas e crónicas, com base na idade da ferida.¹⁰ Feridas agudas têm no máximo 6 horas e encontram-se, possivelmente, livres de bactérias.¹⁰ Feridas subagudas têm entre 6 horas e 5 dias e possuem bactérias que se multiplicam na ferida durante este período.¹⁰ Feridas crónicas são todas as feridas com mais de 5 dias.¹⁰ Esta classificação com base na idade da ferida tem limitações, uma vez que o tempo que uma ferida leva a cicatrizar depende da natureza da ferida, do estado de saúde da pessoa e do ambiente.⁹ Uma forma de distinguir feridas agudas de feridas crónicas é levando em conta o processo de cicatrização da ferida. Nas feridas agudas, o processo de cicatrização ocorre de forma regular e completa, resultando na restauração da estrutura e das funcionalidades do tecido lesado, num período de 5 a 10 dias ou até 30 dias.¹¹ Nas feridas crónicas, os tecidos lesados cicatrizam lentamente não seguindo a mesma sequência de eventos que acontece na cicatrização de feridas agudas, muitas vezes devido a condições de saúde pré-existentes como diabetes ou doenças no sistema circulatório.^{11,12}

1.2. Cicatrização de feridas

A cicatrização de feridas é um processo contínuo no qual células parenquimatosas, células sanguíneas e mediadores solúveis são libertados na região onde ocorreu a ferida, logo após a ocorrência da lesão, desencadeando o processo de reconstrução do tecido danificado e de recuperação das suas funcionalidades. Este processo pode ser dividido em 4 fases principais: (i) hemostasia, (ii) inflamação, (iii) proliferação celular e (iv) remodelação.¹³ Ainda que estas fases se apresentem separadamente, existe alguma sobreposição temporal.¹³

A fase de hemostasia surge logo após a ocorrência da ferida.¹³ Nesta fase, vasos sanguíneos danificados contraem, reduzindo a perda de sangue, e ocorre coagulação do sangue libertado.¹³

A fase inflamatória começa assim que a hemorragia é controlada. Nesta fase, ocorre a libertação de exsudato no local da ferida, a partir dos vasos sanguíneos, uma solução rica em proteínas que permite que a ferida se mantenha húmida e que contém leucócitos, que combatem bactérias presentes no local, nutrientes, oxigénio e proteases, que lidam com detritos celulares resultantes de morte celular causada pelo ferimento.¹⁴ Ao longo das primeiras 48 horas após a ocorrência da ferida, os leucócitos e outras células do sistema imunitário migram para a célula e são ativados, fagocitando microrganismos presentes e corpos estranhos.¹⁵ Em feridas agudas, as enzimas presentes no exsudato desempenham um papel crucial na cicatrização da ferida ao remover proteínas desnaturadas e detritos.¹⁴ No entanto, em feridas crónicas, o exsudato é libertado em excesso, provocando maceração da epiderme, degradação enzimática da epiderme quer intacta, quer lesada, além de afectar a mitose de fibroblastos e a proliferação celular.¹⁴ Como resultado, o doente pode sentir desconforto e dor e a ferida levar mais tempo a cicatrizar.¹⁶

Na fase de proliferação, ocorre a reparação de tecidos, com uma conseqüente diminuição da área da ferida.¹⁵ Esta fase começa dentro das primeiras 48 horas após a ocorrência da ferida,¹⁵ e pode durar até 14 dias.¹⁵ Nesta fase, desenvolvem-se novos vasos sanguíneos e proliferam fibroblastos que produzem colagénio para dar resistência mecânica e forma à pele e, eventualmente, selar a ferida.¹⁵

Na fase de remodelação (ou de maturação¹²), o tecido rico em novos capilares (tecido granuloso) é remodelado, formando-se um tecido com menos vasos sanguíneos, menos células e com uma maior concentração de fibras de colagénio. A remodelação do tecido começa duas a três semanas após a ocorrência da ferida, ocorre de forma gradual e pode durar de alguns meses até 2 anos.¹⁵

Em condições normais, o restabelecimento da epiderme é rápido e eficiente. No entanto, vários factores podem afectar a cicatrização de feridas. Estes factores, podem ser categorizados em factores locais, como o estado de oxigenação e o tipo de microrganismos que infetam a ferida, ou factores sistémicos, relacionados com a condição de saúde da pessoa.¹³ A oxigenação de uma ferida intensifica o metabolismo e migração das células, aumenta a diferenciação de células da epiderme, a proliferação de fibroblastos e a síntese de colagénio.¹³ O tipo de microrganismos presente afecta a duração da fase inflamatória, que é responsável pelo combate aos microrganismos. Se estes resistirem à fase inflamatória, esta pode ser prolongada, comprometendo as fases seguintes. Assim, a ferida entra num estado crónico e não cicatriza.¹³ Factores como idade avançada, diabetes, obesidade, má nutrição, consumo de álcool e de tabaco afectam negativamente o processo de cicatrização de feridas.¹³ Alguma medicação pode também inibir este processo, em particular, o uso de anti-inflamatórios e medicação utilizada em

quimioterapia, que causa redução do metabolismo e divisão celulares.¹³ Se a ferida não mantiver um ambiente húmido, a entrada e distribuição de nutrientes, glóbulos brancos, e a remoção de células mortas pela zona lesionada é dificultada e, em consequência, a cicatrização da ferida torna-se mais complicada e demorada.¹⁴

A cicatrização de uma ferida deve ser o mais rápida possível de forma a evitar infeções e a repor o normal funcionamento do tecido biológico. O uso de pensos como barreira física entre a ferida e o ambiente, reduzem a possibilidade de contaminação por microrganismos, diminuem o grau de desidratação da ferida, absorvem o excesso de exsudato e deste modo facilitam a cicatrização da ferida e reduzem o risco de infeção.

1.3. Pensos

Ao longo da história, têm sido usados pensos, principalmente como forma de manter a ferida seca e isolar a ferida do ambiente exterior.¹² No entanto, já eram também usados pensos que garantiam um ambiente da ferida húmido e, nalguns casos, possuíam propriedades antibacterianas,¹⁷ embora que inadvertidamente, face ao desconhecimento da existência de microrganismos. Na antiga Mesopotâmia eram usados pedaços de argila limpos com água ou leite e cobertos com resina ou mel para tratar feridas superficiais e, na Grécia antiga, era usada lã embebida em água ou vinho a ferver.¹⁷ No século XIX, começaram a ser usados agentes antissépticos no tratamento das feridas e, no séc. XX, antibióticos, de forma a controlar mais facilmente a infeção.¹⁸ Nos anos 80, foi introduzido o primeiro penso moderno, capaz de garantir um ambiente da ferida húmido e de absorver fluidos, como o exsudato em excesso.¹⁸ Atualmente, os pensos são desenvolvidos não só como barreira física, mas também de forma a manterem um ambiente húmido e fornecerem elementos que auxiliem o processo de cicatrização.¹⁷

Os pensos podem ser classificados atendendo a diversos critérios. Atendendo à sua função, dividem-se em (i) oclusivos, (ii) absorventes, (iii) antibacterianos e (iv) desbridamentadores, consoante possuem uma função de barreira, de absorção do exsudato, de acção antibacteriana ou de remoção de tecido morto ou infectado, respectivamente. Quanto ao material que os compõe, podem dividir-se em pensos de (i) hidrocolóide, (ii) alginato, (ii) colagénio, (iii) quitosano ou (iv) poliuretano, entre outros.¹² Atendendo à forma física, podem ser classificados como (i) filmes, (ii) géis, (iii) espumas e (iv) pomadas e, quanto ao modo como cobrem a ferida, podem dividir-se em (i) primários, se estiverem em contacto direto com a ferida, (ii) secundários, se tiverem sobrepostos a um penso primário, e (iii) pensos “ilha”, se tiverem uma zona central absorvente rodeada por uma porção adesiva.¹² O objetivo deste

trabalho é a obtenção de um hidrogel à base de quitosano que possibilite a preparação de um penso primário absorvente e antibacteriano, na forma de filme.

1.4. Liberação controlada de fármacos

Neste trabalho, pretende-se criar um penso antibacteriano, combinando o material que compõe o penso com um agente antibacteriano. Deste modo, através da libertação localizada e controlada do agente antibacteriano, espera-se facilitar a cicatrização de uma ferida superficial, já que os métodos tradicionais mais comuns de administração de fármacos – ingestão e injeção – não se adequam a uma utilização na promoção directa da cicatrização de feridas, pois a administração sistémica do fármaco faz com que actue sobre outras partes do corpo, podendo ter efeitos secundários negativos e imprevisíveis.^{19,20} Ao necessitar ser repetidamente administrado a intervalos de tempo iguais e em quantidades que permitam a atuação eficaz do fármaco até à administração seguinte (Figura 1.1, linha contínua), como a quantidade de fármaco no plasma decai rapidamente, é necessário administrar uma quantidade de fármaco que possibilite que a sua acção dure o tempo desejado.^{19,20} Isto poderá fazer com que o fármaco atinja uma concentração excessiva imediatamente após a sua administração, ultrapassando o limite máximo da sua janela terapêutica, o que pode ter consequências negativas para o paciente.^{19,20} Duas formas de contrariar este problema seriam a administração de doses menores ou a intervalos mais pequenos. Existe uma forma não tradicional de administração de fármacos que supera estas dificuldades: o uso de sistemas de libertação controlada de fármacos.

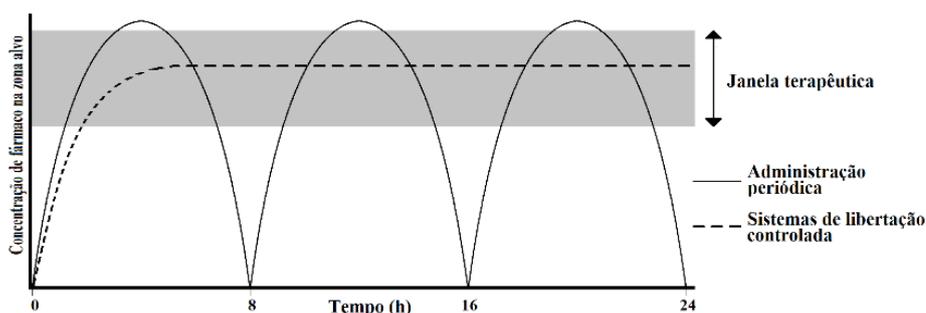


Figura 1.1 – Perfis de concentração de fármaco na zona alvo quando este é administrado de forma periódica, a cada 8 h (linha fina) e quando este é libertado a partir de um sistema de libertação controlada de um fármaco (linha a tracejado).

Os sistemas de libertação controlada de fármacos são dispositivos compostos por uma matriz polimérica e um ou mais fármacos que permitem uma libertação controlada de fármaco no local onde foram colocados (estômago, sistema circulatório, pele, etc.), com a taxa de libertação desejada, através de uma única aplicação²⁰ (Figura 1.1, linha a tracejado). Como a libertação ocorre, essencialmente, a uma taxa constante, o nível de fármaco no local pode ser

mantido num nível desejado e constante durante um longo intervalo de tempo, até se esgotar o fármaco, não existindo o problema de a quantidade de fármaco presente no corpo ser demasiado elevada ou demasiado baixa,²⁰ nem a necessidade de repetir a administração. Além disso, a libertação pode ser feita num local específico (o local onde o sistema de libertação controlada é aplicado), evitando o contacto desnecessário com outras partes do corpo.²⁰ Desta forma, os sistemas de libertação controlada de fármacos constituem uma forma de administração mais avançada do que sistemas administração tradicionais, permitindo uma atuação do fármaco mais eficaz, efeitos secundários mitigados e mais conforto para o paciente. Atualmente, existem vários tipos de sistemas de libertação controlada de fármacos (Figura 1.2), tais como: (i) emulsões (ou microemulsões),²¹ (ii) invólucros poliméricos,²² (iii) hidrogéis²² e (iv) lipossomas.^{19,23}

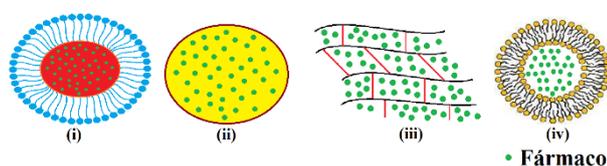


Figura 1.2 – Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de libertação controlada de fármacos. (i) emulsão ou microemulsão, (ii) invólucros poliméricos, (iii) hidrogéis, (iv) lipossomas.

Atendendo ao tipo de processo que controla a libertação do fármaco, podem também ser classificados em (Figura 1.3): (i) sistemas activados pelo solvente, (ii) sistemas biodegradáveis, (iii) sistemas com resposta inteligente e (iv) sistemas controlados por difusão.²² Nos sistemas activados pelo solvente, a libertação controlada de fármaco ocorre por inchaço controlado da rede polimérica e por difusão do fármaco, quando na presença da água presente no ambiente biológico. Nos sistemas biodegradáveis, a matriz polimérica vai-se degradando ao longo tempo, por hidrólise, ao entrar em contacto com a água presente no ambiente biológico, libertando-se o fármaco quer por degradação da matriz, quer por difusão. Em certos

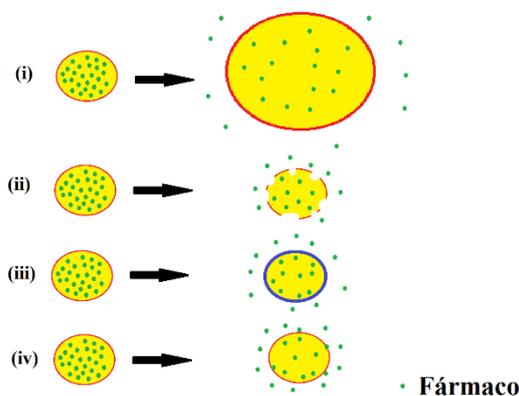


Figura 1.3 – Representação esquemática das diferentes formas de libertação controlada de fármacos. (i) sistemas activados pelo solvente, (ii) sistemas biodegradáveis, (iii) sistemas com resposta inteligente, (iv) sistemas controlados por difusão.

casos, a degradação ocorre apenas a nível superficial, enquanto noutros, toda a matriz sofre degradação. Nos sistemas com resposta inteligente, são usados polímeros cujas propriedades físicas e químicas (capacidade de inchaço, balanço hidrofóbico/hidrofílico ou conformação da molécula) são alteradas face a um estímulo externo (temperatura, pH ou a concentração de uma determinada molécula no meio), sendo a libertação do fármaco despoletada por esse estímulo. Nos sistemas controlados somente por difusão, o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido numa matriz polimérica (sistema do tipo monólito) ou concentrado num núcleo que se encontra rodeado por uma matriz polimérica (sistema do tipo reservatório), mantendo esta sua integridade durante a libertação do fármaco, sendo a libertação controlada somente por difusão através da matriz polimérica. O sistema estudado neste trabalho é um sistema controlado por difusão, do tipo monólito, com o fármaco dissolvido numa matriz polimérica.

1.5. Pensos curativos

Incorporando, num penso, uma substância que auxilie o processo de cicatrização da ferida, passaremos a ter um penso curativo, que se comporta como um sistema de libertação de dessa substância, contribuindo de forma favorável para o processo de cicatrização, ao libertar essa substância de forma localizada e controlada, para além de funcionar como barreira física entre a ferida e o exterior.¹² Esta substância, ou conjunto de substâncias, podem ser (i) um agente antibacteriano (p. ex., um antibiótico), (ii) um agente que auxilia o desbridamento (p. ex., timol ou peróxido de hidrogénio), (iii) um agente anti-inflamatório (p. ex., ibuprofeno), (iv) fatores de crescimento (p. ex., EGF, o Fator de Crescimento Epidérmico) ou (v) suplementos (p. ex., vitaminas e sais minerais).¹²

Há duas formas principais de criar um sistema de libertação controlada de um fármaco a partir de um hidrogel na forma de filme: (i) preparação do filme e sua imersão numa solução de fármaco, de modo a que o fármaco, solúvel em água, penetre no seu interior e (ii) adição do fármaco à formulação que irá dar origem ao filme (Figura 1.4).

1.5.1. Pensos curativos: estado da arte

Em 2019, o mercado de pensos para feridas superficiais foi dominado pelo segmento de mercado de pensos avançados e modernos,³ de entre os quais fazem parte pensos curativos (Tabela 1.1). Existem pensos curativos com constituições e formas físicas diversas, libertando uma vasta gama de fármacos. Encontram-se na forma de filme, fibras, gel ou espuma. A maior parte dos pensos curativos existentes libertam Ag^+ , tendo uma ação antibacteriana. Estes pensos são, com algumas exceções, capazes de absorver grandes quantidades de exsudato. Existem pensos constituídos por silicone (*Biatain Silicone Ag* e *Mepilex® Ag*), poliuretano

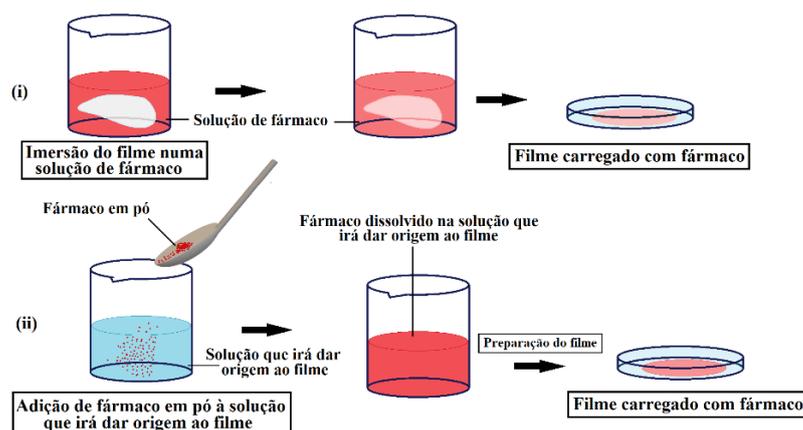


Figura 1.4 – Formas de preparação de um sistema de libertação controlada a partir de um hidrogel na forma de filme: (i) imersão do filme numa solução de fármaco, (ii) adição do fármaco à formulação do filme.

Tabela 1.1 – Exemplos de pensos disponíveis comercialmente que libertam fármacos, utilizados para tratamento de feridas superficiais.

Nome comercial	Componentes	Forma física	Características	Fabricante
<i>Biatain Ibu Non-Adhesive</i>	Poliuretano	Espuma	Liberta Ibuprofeno.	
<i>Biatain Ibu Soft Hold</i>				
<i>Biatain Silicone Ag</i>	Silicone Poliuretano	Espuma	Liberta Ag ⁺ .	
<i>Biatain Ag Non-Adhesive</i>				
<i>Biatain Ag Adhesive</i>	Poliuretano	Espuma	Liberta Ag ⁺ .	<i>Coloplast, Humlebaek, Dinamarca</i>
<i>Biatain Alginate AG</i>	Alginato carboximetilcelulose	Filme	Liberta Ag ⁺ .	
<i>Physiotulle Ag</i>	Poliéster Carboximetilcelulose	Filme	Liberta sulfadiazina de prata.	
<i>Iodoflex Pads</i>	Cadexómero de iodo	Fibra	Liberta iodo.	
<i>Jelonet</i>	Parafina	Fibra	Liberta um antibiótico à escolha.	<i>Smith+Nephew, Watford, Reino Unido</i>
<i>Bactigras</i>	Parafina	Fibra	Liberta acetato de clorexidina.	
<i>Inadine</i>	Poli(etilenoglicol)	Fibras	Liberta iodopovidona.	
<i>KerraContact™ Ag</i>	Poliétileno Poliéster	Filme	Liberta Ag ⁺ .	<i>Kinetic Concepts, San Antonio, Texas, EUA</i>
<i>Povitulle</i>	Não revelados	Filme	Liberta iodopovidona..	<i>CD Medical, Bolton, Reino Unido</i>
<i>CHG Chlorhexidine Gluconate IV</i>	Não revelados	Gel	Liberta gluconato de clorexidina.	<i>3M Tegaderm, St. Paul, Minnesota</i>
<i>PriMatrix® Ag Antimicrobial Dermal Repair Scaffold</i>	Colagénio, prata iónica	Filme	Contém Ag ⁺ .	<i>Integra LifeSciences Holdings Corporation, Plainsboro Township, Nova Jersey, EUA</i>
<i>Melgisorb Ag</i>	Alginato, prata iónica	Fibras	Propriedades antibacterianas e antifúngicas.	<i>MölnlyckeGo, Gotemburgo, Suécia</i>
<i>Mepilex® Ag</i>	Carvão activado, silicone, prata iónica	Espuma	Indicado para queimaduras.	
<i>Aquacel AG + Extra</i>	Carboximetilcelulose, celulose, prata iónica	Gel	Liberta Ag ⁺ , EDTA e cloreto de benzetónio.	<i>Convatec, Deeside, Reino Unido</i>
<i>Calccicare calcium alginate dressing</i>	Alginato	Filme	Liberta Ag ⁺ .	<i>Hollister Incorporated, Illinois, EUA</i>

(*Biatain Ag Adhesive* e *Biatain Ag Non-Adhesive*), alginato (*Biatain Alginate Ag* e *Melgisorb Ag*), colagénio (*PriMatrix® Ag Antimicrobial Dermal Repair Scaffold*), carboximetilcelulose (*Aquacel Ag+*), poliéster/petrolato (*Physiotulle*) e polietileno/poliéster (*Kerracontact Ag*). Os pensos *Biatain Ibu Soft Hold* e *Biatain Ibu Non-Adhesive* são uma espuma de poliuretano com acção anti-inflamatória, através da libertação de ibuprofeno, sendo capazes de absorver grandes quantidades de exsudato. Finalmente, os pensos *Inadine* são feitos à base de fibras de poli(etilenoglicol) e possuem uma acção antisséptica através da libertação de iodopovidona.

Neste trabalho, pretende-se preparar um hidrogel na forma de filme, carregado com um agente antibacteriano, para uma aplicação como penso curativo.

1.5.2. Pensos curativos à base de hidrogéis

Hidrogéis são polímeros constituídos por uma estrutura em rede tridimensional composta por cadeias de polímeros solúveis em água, que se encontram reticuladas.²⁴ Devido à reticulação, obtém-se um polímero insolúvel mas com grande afinidade pela água, por possuir grupos funcionais capazes de ligar moléculas de água. Assim, conseguem absorver e reter grandes quantidades de água e inchar até atingirem volumes várias vezes superiores ao seu volume original.²⁴ São também deformáveis e podem ajustar-se à forma do local onde são aplicados.²⁴ As propriedades físicas e químicas de um hidrogel podem ser facilmente alteradas e moldadas à volta da aplicação específica a que são destinados, graças à variedade de formulações químicas e formas físicas com que podem ser criados e à possibilidade de alterar a sua porosidade, manipulando-se o seu grau de reticulação, e a sua afinidade para com o meio aquoso com que entra em contacto.²⁴

Uma das áreas onde os hidrogéis são cada vez mais aplicados é a área biomédica, já que podem ser preparados a partir de polímeros naturais e biocompatíveis, possibilitando a sua aplicação em vários tipos de tratamentos médicos, como em pensos.²⁴ Graças à sua porosidade, um hidrogel pode ser carregado com um fármaco com actividade antibacteriana (agentes antissépticos e antibióticos) a ser libertado na zona onde é desejado que este atue, criando-se, deste modo, um sistema de libertação controlada de um fármaco a partir de um hidrogel.²⁴ A aplicação de um filme feito de um hidrogel biocompatível e carregado com um agente com actividade antibacteriana num local da pele que sofreu uma lesão, serviria não só como um sistema de libertação controlada de um agente antibacteriano no local lesado, que ajudaria na cicatrização da ferida, mas também como barreira física que protegeria o interior do corpo humano do exterior enquanto a pele não regenerasse. Teria, ainda, a capacidade de (i) manter um ambiente húmido na ferida, cedendo água em caso de desidratação da ferida, (ii) controlar

o excesso de exsudato, absorvendo-o e deixando perder água na forma de vapor, (iii) controlar o nível de O₂, permitindo a sua passagem, de modo a permitir actividade celular.¹²

No entanto, os hidrogéis apresentam algumas limitações que podem dificultar a sua aplicação como sistemas de libertação controlada de fármacos. É característico dos hidrogéis possuírem baixa resistência à tração, o que os torna frágeis e pode levar à sua desintegração ou dissolução prematura.²⁴ Além disso, quando o hidrogel é carregado por imersão numa solução de fármaco, a libertação pode ser demasiado rápida devido ao tamanho dos poros e ao fármaco não conseguir penetrar na matriz em grandes quantidades, acumulando-se na camada mais próxima da superfície.²⁴ Como alternativa, o fármaco poderia ser dissolvido na solução que irá dar origem ao hidrogel, mas nem sempre as condições usadas na preparação do hidrogel (tais como a temperatura e o pH) são compatíveis com o fármaco ou o fármaco não é solúvel nessa solução.

A taxa de libertação e a quantidade carregada de fármaco dependem de factores relacionados com a preparação do hidrogel (material utilizado e sua afinidade com o fármaco, formulação, solvente utilizado, agente reticulante e grau de reticulação, entre outros) e com as condições de carregamento (concentração da solução de fármaco, duração, temperatura e tipo de agitação, entre outros). Estes factores podem ser variados de forma a se chegar a resultados adequados ao uso que se pretende dar.

A quantidade de fármaco libertada pelo penso curativo obtido deve ser suficiente para atingir a Concentração Inibitória Mínima (MIC) para as espécies bacterianas mais comuns em feridas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Corynebacterium* spp.²⁵).^a Um fármaco numa concentração igual à sua MIC₉₀ deve ser capaz de inibir o crescimento de microrganismos em 18 a 24 h.²⁶ Assim, os pensos curativos a preparar neste trabalho devem libertar fármaco numa concentração superior à MIC₉₀ do fármaco para as espécies bacterianas mais comuns em feridas.

Neste trabalho, é pretendido desenvolver um penso que funcione como um sistema de libertação controlada de um agente antibacteriano, feito com base num hidrogel obtido a partir de um polímero biocompatível, ele próprio possuindo também capacidade antibacteriana: o quitosano.

1.5.3. Esterilização de pensos curativos

Qualquer penso curativo deve encontrar-se estéril. O método de esterilização deve ser escolhido de modo a que as propriedades físicas, mecânicas e químicas do penso e do fármaco

^a A MIC₉₀ é a concentração mínima de uma substância com propriedades antimicrobianas que é necessária para inibir o crescimento dos microrganismos em 90% (MIC₉₀).¹⁰⁶

não sejam afetadas negativamente. A esterilização do penso pode ser obtida mantendo condições de assepsia durante o seu fabrico ou por esterilização terminal (no final do processo de fabrico).²⁷ No caso do uso de condições de assepsia, todos os materiais utilizados na produção do penso, tais como matéria-prima, fármaco, recipientes, etc., são esterilizados individualmente, e o penso é fabricado em condições de operação de fabrico estéreis. Esta forma de esterilização exige pessoal altamente treinado e um controlo rigoroso das condições de operação. Apresenta a grande vantagem de o penso não ser exposto a condições que resultem na sua degradação ou alteração. Na esterilização terminal, o penso é esterilizado depois de produzido e embalado. Existem vários métodos de esterilização que podem ser aplicados em pensos curativos, como exposição a radiação ultravioleta (UV), calor seco, a radiação gama ou a óxido de etileno e autoclavagem.^{28,29} A exposição a calor seco requer temperaturas e tempos de exposição elevados, podendo levar à fusão ou degradação do material que constitui o penso e do fármaco.²⁷ A exposição a radiação UV é um método pouco eficaz e inconsistente,²⁹ enquanto que a exposição a radiação gama é rápida e eficaz, mas pode provocar degradação do material utilizado, para além de requerer um local adequado ao trabalho com radiação ionizante.^{28,29} A exposição a óxido de etileno gasoso é um método eficaz mas o óxido de etileno é uma substância inflamável, tóxica e explosiva, e pode degradar a cadeia polimérica.^{28,29} A autoclavagem é um método rápido e eficaz, não liberta resíduos tóxicos e é a mais segura das mencionadas, mas pode levar à degradação do material e fármaco utilizado, dado se utilizar uma temperatura elevada (121 °C, habitualmente).²⁹ Face às vantagens da autoclavagem relativamente aos outros métodos e por se saber que o agente antibacteriano seleccionado neste trabalho era termicamente resistente, escolheu-se este método para esterilizar os filmes preparados no âmbito deste trabalho.

1.6. Quitosano

O quitosano (CS) é um polissacarídeo com origem natural, sendo obtido a partir da desacetilação da quitina, o segundo biopolímero mais comum na natureza.³⁰ Encontra-se presente, p. ex., na carapaça de crustáceos e possui uma estrutura cristalina rígida devido às interações entre grupos acetamida e grupos hidroxilo.³⁰ Tanto a quitina como o CS (Figura 1.5) são constituídos por unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina ligadas por ligações covalentes $\beta(1\rightarrow4)$.³⁰ São caracterizados pelo grau de desacetilação (DD), isto é, pela razão entre o número de grupos D-glucosamina e o número de grupos N-acetil-D-glucosamina.³¹ A quitina não pode ser diretamente utilizada para aplicações práticas por ser rígida e não ser solúvel em água, devido a seu baixo DD. Por desacetilação da quitina através de hidrólise numa solução

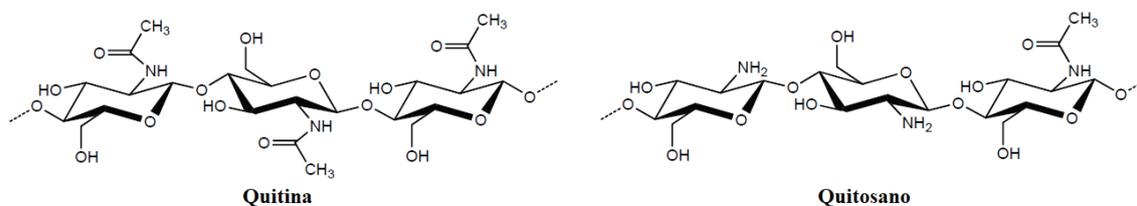


Figura 1.5 – Estrutura molecular da quitina e do quitosano.

de NaOH, ocorre a conversão de grupos acetamida em grupos amínicos, obtendo-se CS. Considera-se que estamos em presença de CS somente quando o DD é superior a 50%.^{8,32-34} O CS é uma base fraca ($pK_a = 6,5$), sendo solúvel em água somente para um valor de pH inferior ao seu pK_a , valor ao qual os seus grupos amínicos se encontram predominantemente protonados, pelo que só se dissolve num meio aquoso ligeiramente ácido.^{31,35,36} As propriedades funcionais do CS, tais como solubilidade, biodegradabilidade e capacidade de inchaço, resultam do grau de protonação dos seus grupos amínicos, pelo que dependem do seu DD.^{8,33,37} Possuindo grupos reactivos, como o grupo hidroxilo e o grupo amínico, é susceptível de ser reticulado quimicamente, formando uma rede tridimensional insolúvel e com grande afinidade para água (hidrogel).

O CS tem sido aplicado em várias áreas como a agricultura (biopesticida ecológico), tratamento de resíduos (remoção de metais e compostos orgânicos por complexação e adsorção), indústria alimentar (aditivo, agente antioxidante e preservante), indústria têxtil (integrado no produto final como agente antibacteriano e no tratamento de águas residuais desta indústria), cosméticos (agente de hidratação ou modificador de viscosidade), e na área biomédica e farmacêutica.³² Sendo um biopolímero hipoalergénico, biodegradável, biocompatível e possuindo propriedades antibacterianas, anticoagulantes e antifúngicas,³⁴ possui uma vasta gama de aplicabilidade na área biomédica e farmacêutica. Nestas áreas, o CS pode ser empregado em várias áreas, tais como, (i) pensos (funcionando como barreira física entre o ambiente exterior e a ferida, protegendo-a de bactérias),³² (ii) cirurgia (como tecido artificial na substituição e reparação de órgãos e partes do corpo humano),³² (iii) engenharia de tecidos (como parte integrante de uma matriz para cultura de osteoblastos),³² (iv) biossensores (na encapsulação de enzimas e proteínas),³⁸ (v) tratamento de cancro (como veículo de libertação localizada de medicamentos antitumorais)³⁹ e (vi) fabrico de lentes de contacto,⁴⁰ entre muitas outras. Além destas aplicações, o CS tem sido aplicado em sistemas de libertação controlada de fármacos e, concretamente, em pensos curativos, graças à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades anti-bacterianas.⁸ A possibilidade de reticulação deste polímero viabiliza o seu uso na preparação de hidrogéis, permitindo a obtenção de uma rede tridimensional capaz de conter um fármaco no seu interior.³⁴

Existem vários métodos de reticulação de CS que permitem a obtenção de um hidrogel, que podem agrupar-se em dois tipos diferentes: reticulação física e reticulação química. A reticulação física é possível graças a interações electrostáticas, iónicas, hidrofóbicas e ligações de hidrogénio.³⁴ A reticulação física do CS é comum ser feita com soluções de alginato de sódio (ALG), heparina ou poli(ácido glutâmico).³⁴ A reticulação química deve-se a ligações covalentes que unem as cadeias do CS, o que permite obter um hidrogel com propriedades mais uniformes e com melhores propriedades mecânicas do que um hidrogel obtido por reticulação física,³⁴ além de o tornarem duradouro e resistente a alterações no meio onde está inserido, como sejam alterações de pH ou de temperatura.⁴¹ A reticulação química do CS pode ser conseguida com recurso a agentes reticulantes que ligam as cadeias poliméricas entre si ou pode ocorrer graças a reacções entre as próprias cadeias de CS.⁴¹ Os agentes reticulantes possuem grupos funcionais que reagem com os grupos hidroxilo ou amínico do quitosano, de modo a ligarem as cadeias poliméricas entre si, criando uma rede tridimensional.⁴¹ Os mais utilizados com CS são dialdeídos, como o glioxal ou o glutaraldeído, que reagem com os grupos amínicos do CS, embora sejam tóxicos,⁴¹ e ácidos dicarboxílicos, tais como ácido maleico,⁴² ácido malónico,⁴² ácido glutâmico⁴³ e ácido succínico,⁴³ em conjunto com uma carbodiimida, que possibilitam a formação de uma ligação amida entre grupos carboxílicos do diácido e grupos amínicos do CS. Neste trabalho, utilizou-se o ácido succínico (SA) e uma carbodiimida solúvel em água. O SA é um ácido que existe naturalmente no corpo humano, sendo produzido e utilizado durante o metabolismo.⁴³ Permite a manutenção de um pH baixo, necessário à manutenção do CS em solução e, sendo um ácido fraco, não provocará hidrólise significativa das ligações glicosídicas do CS.⁴²

As carbodiimidas atuam como reagente intermediário na reacção entre um grupo carboxílico do SA e um grupo amínico do CS⁴⁴ (Figura 1.6). A reacção começa com a protonação da carbodiimida em meio ácido (Figura 1.6(i)) e a sua reacção com um grupo carboxílico ionizado, levando à criação de uma espécie intermediária activa, uma *O*-acilisoureira⁴⁴ (Figura 1.6(ii)). Este intermediário sofre um ataque nucleofílico pelo grupo amínico do CS, formando-se uma ligação amida entre um grupo amínico do CS e um grupo carboxílico do SA e, como subproduto, uma ureia dissubstituída⁴⁴ (Figura 1.6iii). Esta reacção pode ocorrer de um outro modo: a *O*-acilisoureira que se formou como intermediário da reacção entre a carbodiimida protonada e o grupo carboxílico ionizado pode reagir também com outro grupo carboxílico ionizado e dar origem a um anidrido (Figura 1.6iv). Em seguida, por reacção deste anidrido com um grupo amínico do CS, forma-se uma ligação amida⁴⁵ (Figura 1.6v). Na ausência de nucleófilo, o intermediário *O*-acilisoureira pode também reagir com água, regenerando o SA e dando origem a uma ureia dissubstituída⁴⁵ (Figura 1.6vi). Na presença de um excesso de

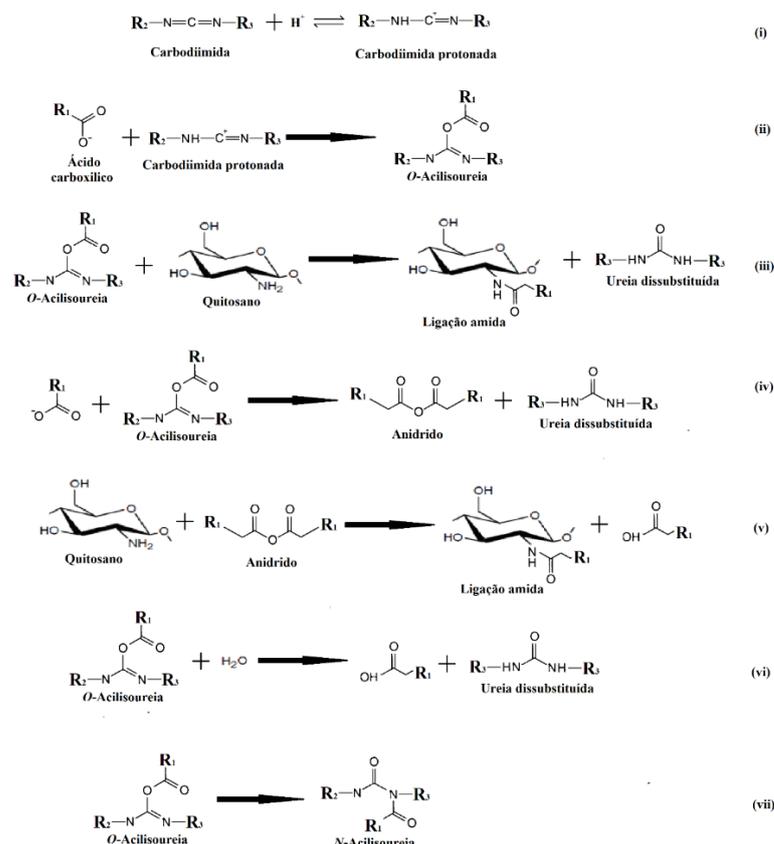


Figura 1.6 – Esquema do conjunto de reações que ocorrem na reticulação do CS por um ácido carboxílico com a ajuda de uma carbodiimida.

carbodiimida, a *O*-acilisoureia pode converter-se em *N*-acilisoureia⁴⁵ (Figura 1.6vii). A ativação do ácido carboxílico ocorre a pH 3,5-4,5, e a formação da ligação amida ocorre mais favoravelmente a pH 4-6. No entanto, as carbodiimidas sofrem hidrólise em meio ácido, apresentando maior estabilidade a pH superior a 6,5.⁴⁴

Com a reticulação do CS com um ácido dicarboxílico e uma carbodiimida, as cadeias poliméricas do CS ficam ligadas entre si através de ligações amida (Figura 1.7). Cada molécula do ácido dicarboxílico liga-se, através dos seus grupos carboxílicos, a dois grupos amínicos de cadeias de CS, formando-se uma ligação amida, resultando uma rede tridimensional de cadeias de CS unidas por moléculas do ácido dicarboxílico.

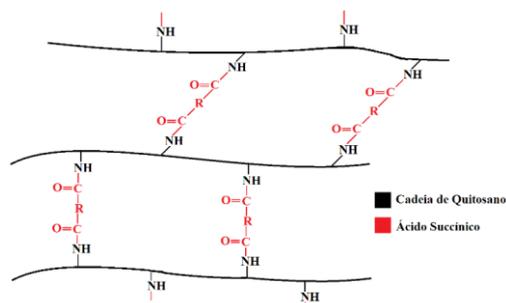


Figura 1.7 – Representação esquemática de cadeias poliméricas de CS reticuladas por SA na presença de uma carbodiimida.

Filmes de CS podem ser preparados por (i) neutralização com NaOH ou vapor de amónia, (ii) por liofilização ou (iii) por evaporação do solvente. No método de neutralização com NaOH, o CS em pó é inicialmente dissolvido numa solução de um ácido orgânico, normalmente, ácido acético ou ácido láctico. Em seguida, a solução é deixada a uma temperatura moderada durante algumas horas a cerca de um dia e o filme formado é imerso numa solução de NaOH e subsequentemente lavado com água destilada.⁴⁶ Numa variante deste método, à solução de CS é adicionada uma solução de NaOH, sendo, em seguida, vertida para um molde e colocada numa estufa para obtenção de filmes por evaporação do solvente.⁴⁷ Por liofilização, a solução de CS em meio ácido é congelada sob vácuo, deixada a temperaturas negativas durante alguns dias e liofilizada, obtendo-se um filme no final do processo.⁴⁸ No método de evaporação de solvente, o CS é dissolvido em meio ácido e a solução obtida é depois submetida a temperaturas moderadas durante um intervalo de tempo prolongado, de modo a evaporar o solvente sem que o CS se degrade. No método de neutralização com vapor de amónia, uma solução de CS é inicialmente submetida a liofilização ou sofre evaporação de solvente, formando-se um filme que é depois exposto a vapor de amónia durante cerca de 3 dias.⁴⁹

Um filme de CS é caracterizado por ser rígido e frágil quando seco.⁵⁰ Isto torna os filmes de CS pouco viáveis para serem aplicados como pensos curativos, que se querem flexíveis e com alguma resistência mecânica. Uma forma de contornar este problema é adicionando um plastificante à formulação do filme, uma molécula que é capaz de aumentar a mobilidade molecular e o volume livre no interior da matriz e diminuir a interação entre cadeias de CS, tornando-o mais flexível e menos frágil.⁵¹ Os plastificantes mais utilizados com o CS são o glicerol (GLY), o xilitol, o sorbitol e o maltitol.⁵⁰ Filmes com GLY como plastificante são mais elásticos e têm um comportamento mais próximo do de um elastómero do que filmes com os outros plastificantes mencionados.⁵⁰ O GLY e as moléculas de água de hidratação que possui, ocupa os espaços entre as cadeias de CS, interagindo com elas através de ligações de hidrogénio, levando à plastificação interna da matriz polimérica por aumento da mobilidade molecular das cadeias do polímero, sem que a continuidade da cadeia polimérica seja afetada.⁵¹

Assim, neste trabalho, é pretendido obter-se um hidrogel de CS na forma de filme, obtido por evaporação do solvente, reticulado por SA com a ajuda de uma carbodiimida, e com GLY como plastificante, que possa ser utilizado como penso. Este filme será carregado com um agente antibacteriano, de modo a possibilitar uma utilização como penso curativo em feridas superficiais.

1.6.1. Pensos à base de quitosano: estado da arte

Têm sido desenvolvidos os seguintes tipos de pensos à base de CS: (i) filmes, (ii) espumas e (iii) fibras, microfibras e nanofibras (Tabela 1.2). Quase todos os pensos à base de CS encontrados no mercado são feitos para ajudar a controlar pequenas hemorragias superficiais e têm a capacidade de absorver quantidades moderadas ou elevadas de exsudato (*Kytocel*, *MaxioCel*, *ChitoClot Bandage*, *Axiostat*). Foi também encontrado um penso que pode ser aplicado em intervenções coronárias (*ChitoClot Pad*), um penso capaz de libertar prata iônica como agente antibacteriano (*Opticell Ag Plus*) e um penso que consegue ajudar a controlar hemorragias severas (*ChitoFlex Pro*). A maior parte destes pensos são na

Tabela 1.2 – Pensos comerciais e não comerciais para tratamento de feridas superficiais, à base de CS, sua composição, forma física e características.

Nome comercial	Componentes	Forma física do CS	Características	Fabricante/Referência
<i>Kytocel</i>	Quitosano	Fibras	Ideal para feridas que libertam bastante exsudato	<i>Aspen Surgical</i> , Caledonia, Michigan, EUA
<i>MaxioCel</i>	Quitosano	Microfibras	Feridas superficiais	<i>Axio</i> , Boston, Massachusetts, EUA
<i>Axiostat</i>	Quitosano	Espuma	Penso com propriedades antimicrobianas	
<i>Opticell Ag Plus</i>	Quitosano	Fibras	Liberta Ag ⁺ .	<i>Medline Industries Inc.</i> , Northfield, Illinois, EUA
<i>ChitoClot Pad</i>	Quitosano	Fibras	Aplicado em intervenções coronárias percutâneas	<i>BenQ Materials</i> , Taoyuan, Taiwan
<i>ChitoClot Bandage</i>	Quitosano	Filme	Possui propriedades antibacterianas	<i>BenQ Materials</i> , Taoyuan, Taiwan
<i>ChitoFlex Pro</i>	Quitosano	Fibras	Capaz de conter hemorragias severas	<i>Tricol Biomedical Inc.</i> , Portland, Oregon, EUA
.*	Quitosano Polietileno	Nanofibras	Boa biocompatibilidade com condrócitos	52
.*	Quitosano Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) Poli(etileno glicol)	Nanofibras	Liberta Ibuprofeno	53
.*	Quitosano	Filme	Liberta Ibuprofeno	54
.*	Quitosano	Filme	Liberta Lidocaína	55
.*	Quitosano Ácido cítrico	Filme	Liberta cloridrato de tetraciclina	56
.*	Quitosano	Filme	Liberta cloridrato de tetraciclina	57
.*	Quitosano Zeína	Filme	Cloridrato de ciprofloxacina	58

* Trabalho relatado na literatura.

forma de fibras (*Kytocel*, *MaxioCel*, *ChitoClot Pad*, *Opticell Ag Plus*, *ChitoFlex Pro*), mas podem ser também na forma de filme (*ChitoClot Bandage*) ou na forma de espuma (*Axiostat*). A maior parte destes pensos não libertam qualquer fármaco com a exceção de um que liberta Ag^+ (*Opticell Ag Plus*).

Os pensos à base de CS que têm sido investigados são maioritariamente na forma de filme ou nanofibras. Excetuando um caso, todos os pensos reportados na literatura apresentados na Tabela 1.2 são do tipo curativo, libertando antibióticos (cloreto de tetraciclina^{56,57} e cloridrato de ciprofloxacina⁵⁸) e agentes anti-inflamatórios (ibuprofeno^{53,54}) ou anestésicos (lidocaína⁵⁵).

1.7. Poli(hexametileno biguanida)

A poli(hexametileno biguanida) (PHMB, também designada polihexanida) (Figura 1.8) é um polímero de baixo peso molecular que age como um agente antisséptico catiónico, apresentando baixa toxicidade, boa estabilidade química, sendo utilizada a nível mundial.^{59,60} É utilizada como agente antisséptico nas soluções para lavagem de lentes de contacto, em produtos de higiene oral, de limpeza perioperatória, de limpeza de piscinas e no tratamento de feridas.⁶¹ No tratamento de feridas, pode ser aplicada sobre a região afetada em solução, na forma de gel ou integrada num penso.⁶² É usada como forma de diminuir a taxa de infeção em feridas crónicas, apresentando um efeito benéfico em feridas causadas por queimaduras, sendo ainda utilizada como agente antisséptico em tratamentos localizados. Neste trabalho, utilizou-se o seu sal hidroclórico (Figura 1.8ii).

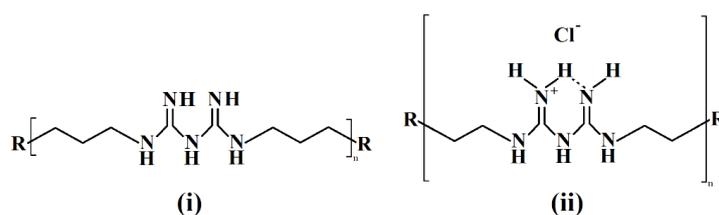


Figura 1.8 – Estrutura da PHMB (i) e do seu sal hidroclórico (ii).

A PHMB é constituída por seis grupos biguanida separados por grupos metileno⁶⁰ (Figura 1.8). Os grupos biguanida agem como bases fortes, encontrando-se monoprotonados a pH neutro. Quando entra em contacto com microrganismos, a PHMB liga-se aos iões fosfato dos fosfolípidos da membrana microbiana, aumentando a sua rigidez e rompendo-a parcialmente, o que leva ao derramamento do conteúdo intracelular para o exterior (lise) e subsequente morte celular, não afectando as células dos tecidos.⁶³ Há evidência mais recente de que a PHMB actua também através de um outro mecanismo, entrando no microrganismo

e provocando condensação dos seus cromossomas, resultando na paragem da divisão celular.⁶⁴ Estas propriedades antibacterianas tornam a PHMB atrativa para ser usada no tratamento de feridas. Como esta molécula é altamente solúvel em água (> 40% em massa) e, apesar de ser um polímero, possui um peso molecular médio relativamente baixo (entre 700 e 4200 g/mol)⁶⁵ Quando em solução, pode ser quantificada através da sua absorvância a 236 nm.⁵⁹ Tem um pK_a de 4,19⁽⁶⁵⁾ e é termicamente estável, só sofrendo degradação térmica acima dos 260 °C, quando em pó.⁵⁹ Quando em solução, ainda que não se tenha encontrado nenhum estudo, há um estudo em que se propõe um método de quantificação da PHMB em solução em que as soluções de PHMB utilizadas são autoclavadas, indicando que deverão resistir à autoclavagem.⁶⁰

A quantidade de PHMB libertada pelo penso curativo deve ser suficiente para que, durante a libertação controlada deste fármaco na ferida, a sua concentração seja igual ou superior à MIC90 para as bactérias mais comuns nas feridas. A MIC90 da PHMB é de 1 mg/L para *Staphylococcus aureus*,⁶⁶ 2 mg/L para *Escherichia coli*.^{67,68} e 8 mg/L para *Pseudomonas aeruginosa*.^{68, b} Uma vez que o volume típico de exsudato libertado numa ferida pode chegar aos 2,8 mL/cm²/dia,⁶⁹ para que a concentração de PHMB na ferida seja igual ou superior à MIC para o microrganismo mais resistente a este fármaco, é necessário libertar, pelo menos, 22,4 µg/cm² de área de ferida/dia. Por outro lado, a aplicação de PHMB repetidamente sobre a pele, com concentrações de cerca de 2% em massa (cerca de 20 mg/L), pode causar reações de sensibilização e, por esta razão a libertação de fármaco, deve ser inferior a esta concentração.⁷⁰

Neste trabalho, pretende-se preparar um filme à base de CS carregado com PHMB, para uma aplicação como penso curativo.

1.7.1. Pensos que libertam PHMB: estado da arte

Como a PHMB apresenta boa estabilidade química, baixa toxicidade e é já amplamente utilizada no tratamento de feridas como agente antisséptico, também tem sido implementada em sistemas de libertação controlada de fármacos para tratamento de feridas superficiais, estando disponível comercialmente (Tabela 1.3). A maior parte dos pensos que libertam PHMB encontrados no mercado são feitos à base de poliuretano (*ActiveHeal PHMB Foam*, *Suprasorb P*, *PHMB Antimicrobial Foam*, *POREX*, *Telfa AMD*). Há ainda pensos feitos de poliéster (*Excilon AMD*), silicone (*PHMB Antimicrobial Silicone Border Foam dressing*) e celulose (*Suprasorb X + PHMB*). Dependendo do penso, a duração da libertação de PHMB pode durar 24 h (*PHMB Antimicrobial Foam*, *Suprasorb X + PHMB*), 3 dias (*Telfa AMD*) ou 7 dias (*ActiveHeal PHMB*, *PHMB Antimicrobial Silicone Border Foam dressing*). Não se encontrou um penso curativo comercial à base de CS que liberte PHMB. No entanto, foram encontrados

^b Não se conseguiu encontrar o valor de MIC90 para os microrganismos *Proteus mirabilis* e *Corynebacterium* spp.

Tabela 1.3 – Pensos comerciais e não comerciais que libertam PHMB para tratamento de feridas superficiais, sua composição, forma física e características.

Nome comercial	Componentes	Forma Física	Modo de introdução da PHMB	Características	Fabricante
<i>Suprasorb X + PHMB</i>	Celulose	Filme	-**	Liberta PHMB durante 24 horas	<i>Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Alemanha</i>
<i>Suprasorb P + PHMB</i>	Poliuretano	Espuma	-**	Liberta PHMB.	
<i>Antimicrobial PHMB Foam Dressing</i>	Poliuretano	Espuma	Impregnado com PHMB	Liberta PHMB durante 24 horas.	<i>Gemcore360, Hudson, Ohio, EUA</i>
<i>PHMB Antimicrobial Silicone Border Foam dressing</i>	Silicone	Espuma	Impregnado com PHMB	Liberta PHMB durante 7 dias.	
<i>Activeheal PHMB foam</i>	Poliuretano	Espuma	-**	Liberta PHMB durante 7 dias.	<i>Activeheal, Winsford, Reino Unido</i>
<i>Telfa AMD</i>	Poliéster Algodão Poliuretano	Filme	Impregnado com 0,2% PHMB.	Liberta PHMB.	<i>Cardinal Health, Dublin, Ohio, EUA</i>
<i>Excilon AMD</i>	Rayon Poliéster	Espuma	-**	Liberta PHMB.	
-*	Poliacrilonitrilo Quitosano	Nanofibra	PHMB imobilizada covalentemente na membrana formada.	Liberta PHMB.	_ <i>71,*</i>
-*	Poli(óxido de etileno) Quitosano	Nanofibra	PHMB presente na solução usada para preparar as nanofibras	Liberta PHMB durante ~24 h.	_ <i>72,*</i>

* Trabalho de investigação relatado na literatura.

** : Informação não revelada pelo fabricante.

dois trabalhos de investigação com o objectivo de desenvolver um penso curativo à base de CS que liberte PHMB. Num desses trabalhos, foram obtidas membranas à base de nanofibras de poliacrilonitrilo e CS. Para carregar a PHMB, amostras foram mergulhadas numa solução de PHMB a 0,05% em massa contendo uma carbodiimida e *N*-sulfosuccinimida, tendo-se obtido nanofibras às quais a PHMB se encontrava ligada covalentemente. Neste trabalho, não foi estudada a cinética de libertação de PHMB, sabendo-se somente que 99,99% das colónias *Escherichia coli* desapareceram 10 minutos após o meio de cultura ser coberto com a membrana com PHMB.⁷¹ No outro trabalho, foram obtidas membranas de nanofibras de CS e poli(óxido de etileno) adicionando ambos os componentes a uma solução de PHMB, cuja concentração variou entre 0,5 mM e 1 mM. Neste trabalho foi avaliada a cinética de libertação da PHMB, sendo inicialmente bastante elevada, com 63% da PHMB libertada nas primeiras 3 h e 85% libertada após 24 h.⁷²

É pretendido que o penso curativo feito à base de CS a desenvolver neste trabalho seja carregado com PHMB e que liberte este fármaco em quantidade suficiente para garantir uma concentração de fármaco na superfície da ferida igual ou superior à MIC₉₀ do organismo mais

resistente presente numa ferida (8 mg/L; *Pseudomonas aeruginosa*⁶⁸), durante um intervalo de tempo adequado. Dado a frequência de troca de pensos curativos comerciais com PHMB ser 3 vezes por semana,⁷³ havendo mesmo pensos que libertam PHMB durante 7 dias (Tabela 1.3), o objectivo mínimo para a duração da libertação será de um pouco mais do que 2 dias, tendo de libertar 22,4 µg de PHMB/cm² de ferida/dia.^c

1.8. Caracterização dos filmes

Os filmes preparados neste trabalho foram caracterizados no que diz respeito às condições necessárias para se removerem resíduos dos reagentes usados na sua preparação, à sua solubilidade, capacidade de inchaço, propriedades termogravimétricas e permeabilidade à PHMB. Quando carregados com PHMB, foi caracterizada a cinética da libertação de PHMB.

1.8.1. Lavagem, capacidade de inchaço e espessura

Filmes de CS preparados na forma de disco foram sujeitos a um processo de lavagem destinado a remover reagentes em excesso e produtos de reacção, tendo-se variado o meio aquoso usado, a temperatura e a duração do processo de lavagem.

A capacidade de inchaço dos filmes foi determinada com filmes lavados e calculada segundo a equação 1.1, em que *CI* é a capacidade de inchaço dos filmes, *m_i* é a massa do filme

$$CI (\%) = \frac{(m_i - m_s)}{m_s} \times 100 \quad 1.1$$

inchado após ter sido imerso numa solução salina tamponada com fosfato (PBS), a pH 7,4 e se atingir uma massa constante, e *m_s* é a massa do filme seco.

A espessura dos filmes é uma variável que pode influenciar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, pelo que, de forma a garantir a possibilidade de comparação dos resultados dos ensaios feitos neste trabalho, os filmes utilizados não devem ter espessuras diferentes, pelo que foram determinadas usando um micrómetro digital.

1.8.2. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica analítica utilizada para caracterizar materiais, que quantifica a perda ou ganho de massa de uma amostra ao longo do tempo, quando sujeita a aquecimento a uma taxa constante.⁷⁴ Em amostras de polímeros, as perdas de massa

^c Considerando o valor da MIC90 para o microrganismo mais resistente (8 mg/L; *Pseudomonas aeruginosa*⁶⁸) e admitindo uma taxa de produção de exsudato de 2,8 mL/cm² de área de ferida/dia⁶⁹.

correspondem à evaporação de água adsorvida ou de outras substâncias voláteis (tais como resíduos de solventes usados na sua preparação ou aditivos de baixo peso molecular) e à volatilização de produtos resultantes da quebra da cadeia polimérica ou saída dos seus grupos substituintes.⁷⁴ O resultado de uma análise de TGA é um termograma que representa a variação da massa de amostra em função da temperatura. É também comum representar-se a primeira derivada desta curva de perda de massa, de forma a melhor se identificar as temperaturas a que ocorre a perda máxima de massa (T_n^{\max}) e entre que intervalo de temperaturas ocorrem.

Na análise por TGA do CS, os termogramas dependem da forma em que a amostra de CS se encontra, do seu peso molecular médio (PM) e do seu grau de desacetilação (DD).⁷⁵ No caso de amostras de CS em pó, é possível, em geral, observar reduções de massa em duas zonas do termograma (Tabela AII.1):³⁵ uma primeira zona (transição 1) entre cerca de 35 °C e 200 °C,^{35,50,76-85} corresponde à evaporação de água adsorvida no CS e de algum outro composto volátil do filme e, uma segunda zona (transição 2, a transição principal), entre 250 °C e 350 °C^(d), correspondente à despolimerização e decomposição do CS.⁸⁰ No caso do CS se encontrar na forma de filme, a temperatura inicial da transição principal é ligeiramente mais baixa, a perda de massa ocorre de forma menos drástica e ao longo dum intervalo de temperatura mais prolongado, sendo a perda total de massa inferior (Tabela AII.1).^{78,81}

A presença de GLY como plastificante aumenta a temperatura a que ocorre a perda de massa máxima na transição principal (T_2^{\max}) em cerca de 10 °C e a ocorrência de uma terceira zona de transição entre a primeira e segunda (entre 180 °C e 225 °C), que corresponde à volatilização de GLY.^{76,77,84,85}

No estudo por TGA que foi feito, pretendeu-se avaliar o efeito da autoclavagem na estabilidade térmica de filmes de CS. Pretendeu-se, ainda, verificar se a presença de PHMB teria algum efeito na estabilidade térmica dos filmes, pois é possível que a PHMB penetre no interior do filme, podendo ser detectável. A degradação térmica da PHMB inicia-se por volta dos 207 °C, apresentando taxas máximas de perda de massa aos 263 °C, 364 °C e 473 °C,⁵⁹ ainda que haja um estudo que obteve taxas máximas de perda de massa aos 240 °C, 360 °C e 520 °C.⁸⁶

1.8.3. Permeabilidade à PHMB

Para se carregar um filme por imersão numa solução de PHMB, a PHMB deverá conseguir penetrar no filme, uma vez que, para o uso que se pretende dar aos filmes obtidos neste trabalho, é importante que a libertação da PHMB seja duradoura, o que não se conseguirá somente com a adsorção da PHMB à superfície do filme. De forma a averiguar se o fármaco

^d Nalguns casos, em a transição principal pode começar nos 200 °C ou ligeiramente abaixo e/ou acabar nos 400 °C.³⁵

consegue penetrar no filme, foi avaliada a permeabilidade à PHMB dos filmes preparados. Para isso, utilizaram-se filmes sem PHMB, montados em células de difusão de Franz (Figura 1.9), em que a câmara dadora contém uma solução de PHMB em PBS (solução salina tamponada a pH 7,4), enquanto que a câmara receptora contém somente PBS. É, assim, possível avaliar se a PHMB consegue atravessar o filme de CS. É, ainda, possível determinar a permeabilidade do filme à PHMB, através do uso de equações derivadas das equações de transferência de massa propostas por Fick. Assim, de acordo com as equações de transferência de massa propostas por

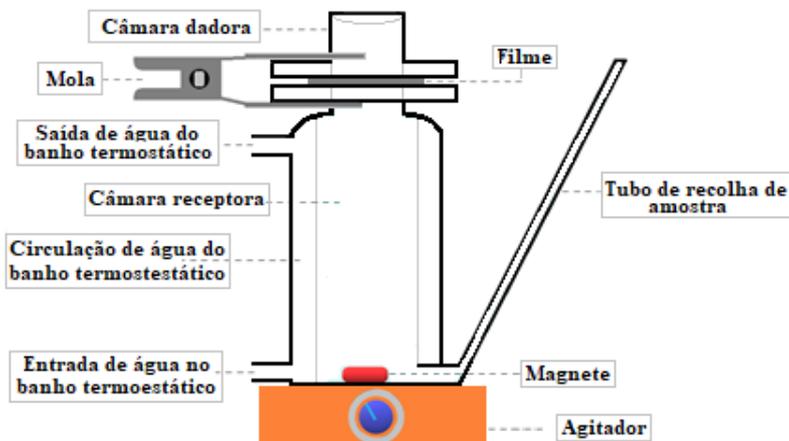


Figura 1.9 – Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.

Fick aplicáveis a sistemas deste tipo, a taxa de transporte de massa por unidade de área de uma secção perpendicular à direcção de transporte, designada fluxo (J), é proporcional ao gradiente de concentração (dc) ao longo do percurso de comprimento dx , sendo D a constante de proporcionalidade, designada coeficiente de difusão (1.ª lei de Fick, Equação 1.2).⁸⁷

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad 1.2$$

Para o caso da difusão de uma substância através de um filme que separa um compartimento que contém uma substância dissolvida a uma dada concentração, de um outro no qual ela se encontra em menor concentração (Figura 1.10), o fluxo no estado estacionário (J_{ss}) é definido pela equação 1.3, onde M é a massa de substância que atravessa o filme por unidade de tempo (t), sendo S a área superficial do filme.⁸⁷

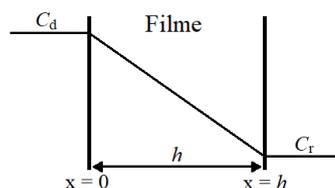


Figura 1.10 - Representação esquemática da difusão em estado estacionário de uma substância através de um filme de espessura h , do lado que se encontra com concentração mais elevada (C_d) para o lado de concentração mais baixa (C_r).

$$J_{SS} = \frac{dM}{Sdt} \quad 1.3$$

Assumindo que a difusão ocorre somente segundo a direcção x (unidireccional) e que D não varia com c , x e t , a 1.ª lei de Fick pode ser convertida na equação 1.4, designada 2.ª lei de Fick, que indica que a variação da concentração no tempo, num dado local do filme, é

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2} \quad 1.4$$

proporcional à variação do gradiente de concentração nesse local.⁸⁷ A transferência de massa em estado estacionário é atingida quando a concentração em ambos os lados da superfície do filme for constante ao longo do tempo, ou seja, quando a equação 1.5 for válida. Nesse caso, dc/dx também é zero, o que significa que a concentração varia linearmente através da espessura do filme (Figura 1.10).⁸⁷ Por integração desta equação, considerando que quando $x = 0$, $c = c_1$

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2} = 0 \quad 1.5$$

e que quando $x = h$, $c = c_2$, sendo c_1 e c_2 as concentrações no filme no lado de maior e de menor concentração, respectivamente, obtém-se a equação 1.6.⁸⁷

$$J_{SS} = \frac{dM}{Sdt} = D \frac{c_1 - c_2}{h} = 0 \quad 1.6$$

Como, em geral, o interior do filme tem características físico-químicas diferentes do solvente e, como tal, a substância pode ter preferência pelo filme ou pelo solvente, as concentrações c_1 e c_2 do interior do filme não são conhecidas. No entanto, elas podem ser substituídas pelo produto entre o coeficiente de partição (K) e a concentração da substância no meio dador (c_d) ou receptor (c_r) (Equação 1.7; Figura 1.11).⁸⁷ Introduzindo esta relação na

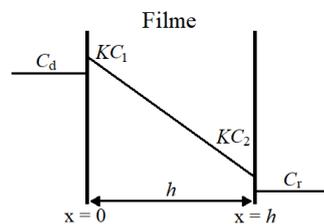


Figura 1.11 - Representação esquemática da difusão em estado estacionário de uma substância através de um filme de espessura h , com maior afinidade para a substância ($K > 1$) do lado com concentração de meio mais elevada (C_d) para o lado de concentração de meio mais baixa (C_r).

$$K = \frac{c_1}{c_d} = \frac{c_2}{c_r} \quad 1.7$$

equação 1.5, obtém-se a equação 1.8 e, substituindo a equação 1.3 nesta equação e designando

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DSK(C_d - C_r)}{h} \quad 1.8$$

$(DK)/h$ por P , o coeficiente de permeabilidade do filme à substância que o atravessou (equação 1.9), sob condições em que a diluição da substância no meio receptor é tal que se pode considerar que c_r é igual a zero (condições de *infinite sink*), a equação 7 transforma-se nas

$$P = \frac{DK}{h} \quad 1.9$$

equações 1.10 e 1.11.⁸⁷ Assim, representando a massa total de substância que atravessa o filme

$$J_{ss} = \frac{DKC_d}{h} \quad 1.10$$

$$P = \frac{J_{ss}}{C_d} \quad 1.11$$

por unidade de área, em função do tempo, pode calcular-se J_{ss} a partir do declive da porção linear inicial do gráfico (estado estacionário) e, a partir dele, o coeficiente de permeabilidade do filme à substância. O coeficiente de difusão pode ser calculado através da equação 1.12 que o relaciona com o tempo de latência (t_L), o tempo que a substância leva a atravessar o filme de espessura h .⁸⁷⁻⁸⁹ Este tempo corresponde ao ponto em que o eixo das abcissas do gráfico é atravessado por uma extrapolação da porção linear da curva de variação da massa total de substância que atravessa o filme em função do tempo.

$$D = \frac{h^2}{6 t_L} \quad 1.12$$

1.9. Caracterização da libertação de PHMB

Para se estudar a taxa e a duração da libertação de um fármaco a partir de um sistema de libertação controlada, bem como a concentração de fármaco libertada, começa-se por fazer ensaios *in vitro* nos quais é medida a quantidade de fármaco libertada ao longo do tempo, procurando-se condições que se aproximem da aplicação desejada. Neste trabalho, as condições a utilizar deverão ser um modelo do ambiente de uma ferida. Como meio para o qual o fármaco se libertará, escolheu-se o PBS a pH 7,4, apesar de ser um meio muito diferente do exsudato, pois não contém proteínas, glicoproteínas, glucose, diversos sais inorgânicos, fatores de crescimento, enzimas, plaquetas e leucócitos, entre outros,¹⁴ mas possui a mesma força iónica dos fluidos biológicos, possui um valor de pH dentro do intervalo de valores de pH que ocorrem em feridas (7,3 – 8,9)⁹⁰ e tem sido usado em estudos de libertação de fármacos com vista a uma

aplicação como pensos curativos.⁹¹ Escolheu-se uma temperatura de 34 °C, por se tratar da temperatura típica de uma ferida superficial crónica infetada, provocada por uma úlcera localizada na zona da perna.⁹² Optou-se, ainda, por fazer os ensaios de libertação sob condições de “perfeita” solubilidade da PHMB (condições de *infinite sink*), que ocorrem quando o volume de meio para o qual o fármaco é libertado é, pelo menos, 3 a 10 vezes superior ao volume de saturação da solução de fármaco nesse meio,⁹³ de modo a possibilitar a comparação com outros estudos na literatura feitos nestas condições. No entanto, numa ferida, estas condições não deverão ocorrer, dado o reduzido volume do exsudato (entre 0,6 e 2,8 mL/cm² de área de ferida/dia).⁶⁹

Quanto ao modo de contacto entre o hidrogel com fármaco e o meio para o qual o fármaco irá ser libertado, o modo mais relevante para a aplicação como penso é aquele em que só uma das faces do filme contacta o meio. É possível conseguir este tipo de contacto montando o filme, na forma de disco, numa célula de difusão de Franz que, na câmara receptora contém o meio (PBS) e que possui a câmara dadora vazia. Assim, somente a face inferior do filme se encontra em contacto com o meio presente na câmara receptora. Recolhendo amostras do meio na câmara receptora, obtém-se o perfil da variação da quantidade de fármaco libertada e acumulada ao longo do tempo. Com este ensaio, consegue-se estudar a cinética de libertação do fármaco a partir de uma só face do filme e, assim, ficar a conhecer a duração de libertação e a quantidade de fármaco libertado.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação de filmes à base de quitosano

2.1.1. Filmes de quitosano reticulado com ácido succínico e uma carbodiimida

Na preparação de hidrogéis de quitosano na forma de filme, utilizou-se uma formulação anteriormente desenvolvida no laboratório, designada WD9.1. Para isso, os vários reagentes foram dissolvidos em 30 mL de ácido láctico (LA) a 1% (v/v) (*Fisher Scientific*, EUA, 85-90%) em água destilada, com o CS (*Acros Organics*, EUA, PM 100000-300000 g/mol) a ser adicionado em primeiro lugar, seguido do ácido succínico (SA) (*VWR International*, EUA, $\geq 99,5\%$), o glicerol (GLY) (*Fisher Scientific*, EUA, 99%) e, por último, a *N*-ciclohexil-*N'*-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-*p*-toluenossulfonato (CMC; *Fisher Scientific*, EUA, 95%), estando as concentrações de cada reagente indicadas na Tabela 2.1. Para a preparação desta solução, os reagentes que constam na Tabela 2.1 foram adicionados ao solvente (LA a 1%

Tabela 2.1 – Concentração de cada componente da formulação WD9.1.

Reagente	Concentração
LA	1% v/v
CS	2% m/v
SA	2% m/v
GLY	5% m/v
CMC	0,5 % m/v

(v/v)), um de cada vez, de forma a evitar a formação de aglomerados difíceis de dissolver, tendo-se recorrido a agitação magnética e, sempre que necessário, embora de forma moderada, a ultrassons (banho de ultrassons VWR UCS300T, VWR, EUA). Depois da dissolução do último componente, deixou-se repousar a solução durante 30 min. Para a preparação dos filmes, transferiu-se a solução para dois tipos de moldes: (i) a base de uma caixa de Petri com 5 cm de diâmetro, na qual se colocaram 9 mL da solução e (ii) uma caixa de lentes de contacto (*blister*), com 2 cm de diâmetro, na qual se colocaram 1,76 mL da solução^e (Figura 2.1). Após 72 h a 50 °C numa estufa, os filmes foram retirados do molde com a ajuda de uma espátula e, com um vazador de

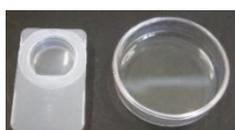


Figura 2.1 – *Blister* de 2 cm de diâmetro (esquerda) e base da caixa de Petri com 5 cm de diâmetro (direita).

rolhas, foram cortados discos com o diâmetro necessário.

^e Volume seleccionado de forma a manter a razão volume/área e, assim, manter a espessura do filme.

Foi, também preparada outra formulação na qual o solvente usado na formulação WD9.1 (LA a 1% (v/v)) foi substituído por uma solução diluída de HCl (*Merck Group*, Alemanha, 37%) (WD9.1a) (Tabela 2.2), tendo-se seguido as condições usadas para a formação de filmes a partir da formulação WD9.1, com a exceção de se terem usado *blisters* como moldes.

Tabela 2.2 – Constituição das formulações WD9.1 e WD9.1a.

Nome	Solvente, concentração (% v/v ou M)	Formulação (% m/v)			
		CS	SA	GLY	CMC
WD9.1	LA, 1%	2	2	5	0,5
WD9.1a	HCl, 0,3% (0,09 M)	1,6	1,6	4	0,4

Lavagem dos filmes WD9.1

Os discos de CS preparados com a formulação WD9.1 foram sujeitos a um processo de lavagem destinado a remover reagentes em excesso e produtos de reacção. Este processo dividiu-se em várias etapas. Em cada etapa, um disco foi mergulhado num recipiente que continha um volume definido de um meio de lavagem, durante determinado tempo e a uma dada temperatura, sujeito ou não a agitação numa incubadora com agitação orbital (*Comecta Mod. 200D*, *Comecta S.A.*, Espanha). Entre cada etapa, houve troca de meio. Como meios de lavagem, usaram-se uma solução de NaCl a 0,9% (m/v) (99,5%, *Karl Roth*, Alemanha) e uma solução de PBS (NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, fosfato 10 mM; *Karl Roth*, Alemanha) a pH 7,4. Os discos utilizados nos ensaios de permeabilidade foram lavados seguindo um protocolo de lavagem distinto dos discos utilizados nos ensaios de libertação. Na Tabela 2.3 encontram-se as várias etapas dos protocolos de lavagem de cada conjunto de discos.

No final de cada etapa, recolheu-se uma amostra do meio, sendo subsequentemente analisada num espectrofotómetro *Jenway 7315* (*Jenway*, Reino Unido) para determinação do espectro de absorção no UV e medir a absorvância a 236 nm (comprimento de onda utilizado na quantificação do fármaco utilizado neste trabalho). O processo de lavagem foi continuado até esta absorvância ser nula.

2.1.2. Filmes de quitosano e alginato

Na formulação designada WD11 (Tabela 2.4), todos os reagentes foram adicionados de forma idêntica à da formulação WD9.1, tendo ambas as formulações igual composição, com a exceção de que o alginato (ALG; alginato de sódio, *Acros Organics*, EUA) foi adicionado a seguir ao SA numa concentração de 5% (m/v). Foram, ainda, testadas algumas variações na

Tabela 2.3 – Protocolos de lavagem para os discos utilizados nos ensaios de permeabilidade (diâmetro: 2,3 cm) e nos ensaios de libertação (diâmetro: 1,65 cm). T_{amb} : temperatura ambiente.

Tempo	Meio	Vol. (mL)	T (°C)	Agitação
Discos utilizados nos ensaios de permeabilidade				
0 h	NaCl 0,9 %	50	50	Não
2 h	NaCl 0,9 %	50	50	Não
4 h	PBS	50	50	Não
8 h	PBS	50	34	100 rpm
1 dia	PBS	10	34	Não
4 dias	PBS	10	T_{amb}	Não
5 dias	PBS	10	T_{amb}	Não
6,2 dias	PBS	10	T_{amb}	Não
7,2 dias	PBS	10	T_{amb}	Não
Discos utilizados nos ensaios de libertação				
0 h	NaCl 0,9 %	150	50	100 rpm
15 h	NaCl 0,9 %	50	34	Não
17 h	NaCl 0,9 %	50	34	Não
20 h	PBS	50	34	Não
21 h	PBS	50	34	Não
1,6 dias	PBS	10	34	Não
1,7 dias	PBS	10	34	Não
1,8 dias	PBS	10	34	Não
1,9 dias	PBS	10	34	Não
2,6 dias	PBS	10	34	Não

Tabela 2.4 – Composição das formulações de CS e ALG.

Nome	Solvente, concentração (% v/v ou m/v*)	Formulação (% , m/v)				
		CS	SA	ALG	GLY	CMC
WD11	LA (1)	2	2	5	5	0,5
WD11.1	LA (1)	2	0	1	5	0,5
WD11.1a	LA (0,8) e NaOH (0,5)	1,5	0	0,8	3,8	0,4
WD11.1b	LA (1)	1,3	0	0,33	0	0
WD11.1c	LA (1)	1,9	0	0,05	0	0
WD11.1d	AA (1)	2	0	1	5	0,5
WD11.1d1	AA*(0,5) e PBS (50)	1	0	0,5	0	0
WD11.1d2	AA** (1)	1,3	0	0,3	0	0
WD11.1d3	AA** (1)	1,3	0	0,2	0	0
WD11.1d4	AA (0,5) e água destilada	0,4	0	0,4	0	0
WD11.1d5	AA (0,5) e água destilada	0,4	0	0,17	0	0
WD11.1d6	AA (0,5) e água destilada	0,4	0	0,93	0	0

* % m/v no caso do NaOH.

composição da formulação WD11, indicadas na Tabela 2.4, incluindo variação do solvente, tendo sido usado ácido acético (AA, Fisher Scientific, EUA, 99,8%), uma solução de NaOH (*Fluka Chemie AG, Suíça, ≥ 98%*), PBS e água destilada.

2.1. Avaliação da solubilidade dos filmes

Para se avaliar se os filmes preparados não se dissolviam em água destilada e em PBS, colocaram-se discos nestes meios por diversos períodos de tempo, quer à temperatura ambiente, quer a 34 °C, em caixas de Petri fechadas, renovando-se o meio diariamente.

2.2. Determinação da capacidade de inchaço dos filmes

A capacidade de inchaço dos filmes da formulação WD9.1 foi calculada com base na equação 1.1 (subsecção 1.8.1). Para isso, mergulharam-se discos numa solução de PBS à temperatura ambiente, até se obter uma massa constante (massa do disco inchado). A massa dos discos secos foi obtida colocando os discos numa estufa a 50 °C durante vários dias e, depois, num exsiccador com sílica-gel seca, até a massa do disco permanecer constante.

2.3. Determinação da espessura dos filmes

A espessura dos filmes secos ou inchados foi medida utilizando um micrómetro digital (*Digimatic Micrometer, Series 293, Mitutoyo, Japão*). Calculou-se o valor médio da espessura medindo 3 discos diferentes, sendo cada disco medido em 3 pontos diferentes.

2.4. Análise termogravimétrica dos filmes

Amostras de filmes WD9.1 foram analisadas por TGA, recorrendo ao equipamento TGA Q500 da *Thermal Analysis Instruments*, EUA. Foram analisadas as seguintes amostras:

1. Filme não esterilizado;
2. Filme seco, colocado num tubo de Falcon de 15 mL fechado, esterilizado por autoclavagem;
3. Filme inchado e colocado em 5 mL de PBS, num tubo de Falcon de 15 mL fechado, esterilizado por autoclavagem;
4. Filme inchado e colocado em 5 mL de uma solução de PHMB a 10 mg/mL em PBS, num tubo de Falcon de 15 mL fechado, esterilizado por autoclavagem.

As amostras a estudar, com massas compreendidas entre 1,4 e 4,2 mg, depois de esterilizadas por autoclavagem (121 °C, 1,4 atm, 22 min; subsecção 1.5.3), foram desidratadas numa estufa a 40 °C e mantidas num exsiccador até serem analisadas. Em cada análise, obteve-se o termograma de TGA submetendo a amostra a um aumento de temperatura dos 25 °C aos 600 °C, a uma taxa constante de 10 °C/min, sob uma atmosfera de azoto. Obteve-se, ainda a curva de DTG (Termogravimetria Diferencial) a partir da 1.^a derivada da curva de perda de massa em relação à temperatura (curva de TGA).

2.5. Permeabilidade dos filmes à PHMB

Montaram-se discos (diâmetro: 2 cm) WD9.1 em células de difusão de Franz calibradas, com uma capacidade de 14,5 mL e uma abertura de 1,5 cm de diâmetro (área = 1,7 cm²), sendo

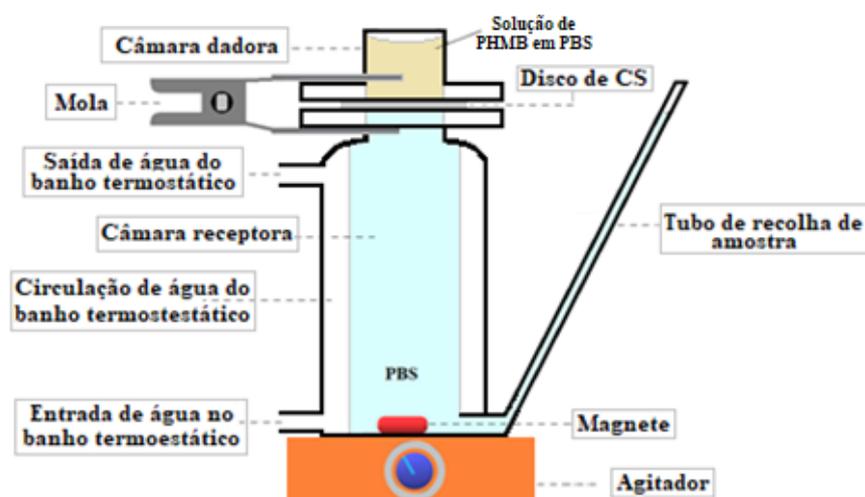


Figura 2.2 – Esquema do modo como a célula de difusão de Franz foi utilizada nos ensaios de permeabilidade à PHMB de discos WD9.1.

mantidas a uma temperatura de 34 °C por recirculação de água a partir de um banho termostático (Figura 2.2). A câmara dadora foi cheia com uma solução de PHMB em PBS (com uma concentração de 5 ou 10 mg/mL) e a câmara receptora, foi cheia com uma solução de PBS (desgaseificada por vácuo) até ao topo e até à marca de calibração no tubo lateral e colocada sob agitação magnética a ~660 rpm,^f tendo-se colocado o disco a ensaiar (2,3 cm de diâmetro) diretamente sobre a abertura da câmara receptora da célula e em contacto com a solução receptora, de modo a não existirem bolhas de ar aprisionadas na base do disco. Para se determinar a massa de PHMB que atravessa o disco por difusão, recolheram-se amostras de 0,4 mL pelo tubo de recolha, com o auxílio de uma seringa Hamilton de 1 mL munida de uma agulha com 12 cm de comprimento, previamente calibrada. De modo a se manter constante o volume de solução receptora, adicionou-se igual volume de PBS à célula após a recolha de cada amostra. A massa de PHMB que se acumulou na câmara receptora foi determinada a partir da absorvância a 236 nm (branco: PBS), utilizando-se a curva de calibração referida na secção 2.7. Este estudo foi feito em duplicado (dois discos em duas células de difusão de Franz, ensaiados em simultâneo).

A curva cinética de difusão da PHMB através do filme foi obtida representando-se a massa acumulada de PHMB que atravessou o disco por unidade de área do disco exposta, em função do tempo. Para isso, calculou-se: (i) a massa de PHMB presente dentro da câmara receptora da célula de Franz em cada momento da recolha, (ii) a massa de PHMB presente em cada amostra recolhida e (iii) a soma, para cada tempo, da massa de PHMB presente em todas as amostras anteriormente recolhidas e descartadas, à massa de PHMB presente no interior da célula, de que resulta a massa de PHMB que se acumulou na câmara receptora da célula. Este valor foi dividido pela área do disco exposta à solução de PBS.

^f Valor obtido a partir da posição do botão de selecção da velocidade de agitação e da velocidade de agitação máxima do agitador, admitindo uma variação linear entre a posição do botão e a velocidade de agitação (agitador: Rotilabo M3, Carl Roth, Alemanha).

2.6. Quantificação da PHMB

As concentrações de amostras de soluções de PHMB provenientes dos vários estudos feitos foram determinadas com recurso a um espectrofotómetro *Jenway 7315* (*Jenway*, Reino Unido), por medição da absorvância a 236 nm.⁵⁹ Para se calcular a concentração de PHMB através da absorvância a 236 nm, construiu-se uma curva de calibração representando a absorvância a 236 nm em função da concentração de PHMB (Anexo I). Para tal, mediu-se a absorvância de soluções de concentração conhecida de PHMB em PBS, na gama 2 a 30 µg/mL, utilizando PBS como branco.

2.7. Carregamento de PHMB nos filmes

Adotaram-se dois métodos de carregamento da PHMB nos filmes: (i) por imersão dos filmes numa solução de PHMB e (ii) por adição da PHMB à formulação, antes da formação do filme.

2.7.1. Carregamento por imersão

Discos lavados de 1,2 cm de diâmetro, secos a 40 °C até atingirem uma massa constante, ou de 2 cm de diâmetro, inchados em PBS, foram colocados em tubos de Falcon de 15 mL contendo 5 mL de uma solução de hidrocloreto de poli(hexametileno biguanida) (PHMB, da *Biosynth Carbosynth*, Reino Unido, min. 94%) com uma concentração de 5 mg/mL ou 10 mg/mL em PBS, durante 24 h, a 34 °C, sob agitação a 100 rpm, numa incubadora. Este carregamento foi feito em triplicado (3 tubos de Falcon, cada um com um disco) e, uma parte da solução de PHMB de partida, foi também incubada num tubo, a par dos tubos com discos. Após a incubação, os discos foram retirados da solução de PHMB, limpando-se o seu exterior através de um contacto rápido com papel absorvente, de modo a remover a solução de fármaco que molhava a superfície do disco, sendo imediatamente montados nas células utilizadas para os estudos de libertação (células de difusão de Franz).

Numa variante do carregamento por imersão, parte do carregamento decorreu em simultâneo com a esterilização dos discos por autoclavagem. Para isso, os discos foram autoclavados em tubos de Falcon de 15 mL fechados, contendo 5 mL de uma solução de PHMB com uma concentração de 10 mg/mL em PBS. Autoclavou-se, também, um disco dentro de um tubo de Falcon contendo 5 mL de PBS (branco). A autoclavagem foi efetuada a 121 °C e a uma pressão de 1,4 atm durante 22 min, num autoclave *Prestige Medical*, modelo *Omega Media* (*Prestige Medical*, Reino Unido). As amostras estiveram dentro do autoclave um total de 80 min, tendo demorado 18 min a atingir-se a temperatura e pressão necessárias. Após serem

retirados do autoclave, o carregamento continuou a decorrer durante mais 24 h, à T_{amb} .

Calculou-se a quantidade de PHMB carregada nos discos a partir da diferença entre a massa de PHMB presente na solução de PHMB antes e após o carregamento, a partir da absorvância a 236 nm (secção 2.6), em triplicado, de amostras da solução de PHMB que tinha sido incubada a par dos discos e da solução de PHMB em que cada disco esteve imerso, respectivamente, tendo-se usado PBS como branco.

2.7.2. Carregamento por adição à formulação

Foram preparadas formulações WD9.1 contendo PHMB, seguindo todo o procedimento mencionado na subsecção 2.1.1, mas adicionando PHMB, de modo a estar presente numa concentração de 5 ou 10% m/m em relação à massa de CS, tendo sido adicionada em momentos diferentes do procedimento (Tabela 2.5). Após a dissolução da CMC, alterou-se o tempo de espera antes da adição de PHMB: (i) adição imediatamente após a dissolução da CMC, (ii) 30 min após ou (iii) 15 h após, à temperatura ambiente.

Tabela 2.5 – Composição, concentração e momento de adição de PHMB nas formulações WD9.1 às quais foi adicionada PHMB.

Nome	Solvente	Formulação (% m/v)				[PHMB] em relação a CS (% m/m)	Momento da adição da PHMB*
		CS	SA	GLY	CMC		
WD9.1_5						5	Final
WD9.1_5a1	LA 1%	2	2	5	0,5	10	Final + 15 h (T_{amb})
WD9.1_10						10	Final
WD9.1_10a1	LA 1%	2	2	5	0,5	20	Final + 15 h (T_{amb})
WD9.1_20							Final
WD9.1_20a2	LA 1%	2	2	5	0,5		Após CS
WD9.4_10a1	AA 1%	2	2	5	0,5	10	Final + 30 min (T_{amb})
WD9.5_10a1	HCl 0,3% (0,09 M)	1,6	1,6	4	0,4	10	Final + 1 h (T_{amb})
WD9.5.1_10a1	HCl 0,2% (0,07 M)	2	2	5	0,5		Final + 1 h (T_{amb})

* *Final*: PHMB adicionada após o último componente da formulação (CMC); *Final + intervalo de tempo (T_{amb})*: PHMB adicionada após se aguardar o intervalo de tempo indicado, à temperatura ambiente, depois da CMC se dissolver.

2.8. Caracterização da libertação de PHMB

Discos de 1,2 ou 2 cm de diâmetro carregados com PHMB por imersão como referido na subsecção 2.7.1, foram montados em células de difusão de Franz que possuíam a câmara recetora tal como mencionado na secção 2.5, mas possuindo a câmara dadora vazia (Figura 2.3). Colocou-se um disco transparente de PVC sobre o disco a ensaiar e, sobre este, a câmara dadora vazia. Este conjunto câmara recetora/disco WD9.1/disco de PVC/câmara dadora vazia foi mantido unido por meio de uma mola. As células de difusão de Franz utilizadas possuíam uma câmara receptora de 5,3 mL (para discos de 1,2 cm de diâmetro) ou 14,5 mL (discos de 2

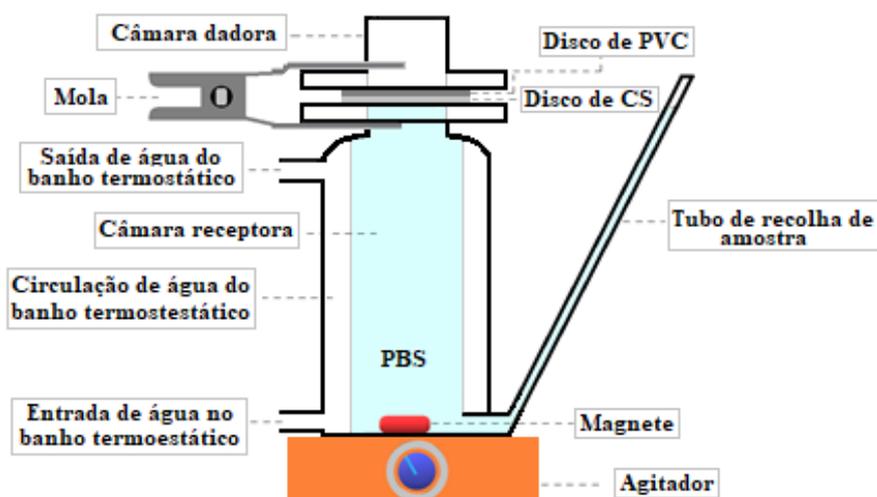


Figura 2.3 – Esquema do modo como a célula de difusão de Franz foi utilizada nos ensaios de liberação de PHMB a partir de discos WD9.1.

cm de diâmetro), tendo-se recolhido amostras de 0,2 ou 0,4 mL, respectivamente (com reposição de igual volume de PBS) ao longo do tempo. A absorvância a 236 nm das amostras recolhidas na câmara receptora foi convertida em massa de PHMB acumulada por unidade de área do disco exposta, tal como referido na secção 2.5. Todos os ensaios foram feitos em triplicado (3 discos em 3 células de Franz, em simultâneo).

2.9. Análise estatística

Os resultados de conjuntos de réplicas foram apresentados como a média \pm desvio padrão, tendo-se trabalhado com três réplicas, sempre que possível. Para a comparação de médias, quando se compararam duas ($n = 2$), usou-se o teste t de Student e, quando se compararam mais do que duas ($n > 2$), utilizou-se um teste ANOVA de fator único. Quando, neste caso, se encontraram diferenças significativas, usou-se o teste de *Tukey* para identificar entre que médias existia uma diferença significativa. Todos os testes estatísticos foram levados a cabo com um nível de significância de 95%.

3. Resultados e Discussão

3.1. Preparação de filmes à base de quitosano

3.1.1. Filmes de quitosano reticulado com ácido succínico e uma carbodiimida

Com o objectivo de desenvolver pensos a partir de um hidrogel à base de quitosano, que libertassem um agente antibacteriano que auxiliasse no combate a infecções presentes nas feridas e, assim, auxiliasse o processo de cicatrização da ferida, procurou-se preparar hidrogéis na forma de filme que exibissem características que possibilitassem essa sua utilização, tais como, serem manuseáveis e serem capazes de carregar e libertar PHMB durante pouco mais de 2 dias sem se dissolverem ou degradarem quando em contacto com exudato. Tinham, ainda, de possuir características físicas que permitissem efectuar um ensaio da libertação em que a PHMB só se libertasse a partir de uma das faces do filme, situação encontrada na aplicação como penso, o que implicava poderem ser montados numa célula que possibilitava este tipo de estudo (célula de difusão de Franz, Figura 2.3, secção 2.8). O trabalho foi iniciado utilizando uma formulação anteriormente desenvolvida (designada WD9.1; Tabela 2.1, subsecção 2.1.1), que permitia preparar filmes com algumas destas características (Figura 3.1). Nesta formulação, os diversos componentes foram dissolvidos com a ajuda de agitação magnética, à temperatura ambiente, e por breve exposição a ultrassons, essencialmente para libertar bolhas de ar aprisionadas na solução, já que o uso de ultrassons pode degradar o CS.⁹⁴

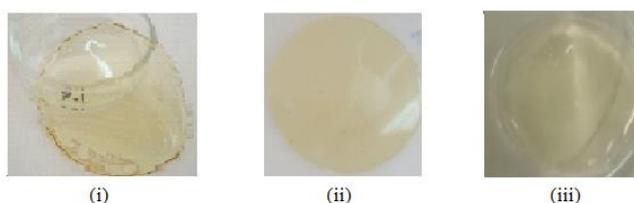


Figura 3.1 – Filmes à base de CS da formulação WD9.1, tal como obtido (i), cortado na forma de disco (ii) e lavado e inchado (iii).

Os filmes da formulação WD9.1 foram fáceis de remover do molde, apresentaram uma cor amarelo torrado, eram uniformes, lisos e flexíveis (Tabela 3.1). A insolubilidade em água e em PBS indica que se encontram reticulados, ocorrendo esta reticulação por formação de uma ligação amida entre os dois grupos carboxílicos do SA e dois grupos amínicos do CS (Figura 1.6 e Figura 1.7, secção 1.6). A carbodiimida CMC participa nesta reacção, activando o ácido carboxílico e convertendo-o quer numa *O*-acilisourea, quer num derivado anidrido, muito mais reactivos com grupos amínicos do que o ácido carboxílico. Como o solvente usado (LA) é um ácido carboxílico, irá também reagir com a carbodiimida, consumindo-a, mas não dando

Tabela 3.1 – Características dos filmes WD9.1 e WD9.1a após retirada do respetivo molde, sua solubilidade em água destilada e em PBS, capacidade de inchaço em PBS e espessura após retirada do molde (secos) e inchados em PBS.

Filme	Solvente, concentração (% v/v ou M)	Remoção do molde	Características dos filmes	Fotografia	Dissolução em água, T_{amb}	Dissolução em PBS, 34 °C	Capacidade de inchaço (%)	Espessura (seco inchado) (mm)
WD9.1	LA 1%	Fácil	Amarelo torrado, uniforme, liso, flexível		Não se dissolveu	Não se dissolveu	1415 ± 154	0,31 ± 0,02 0,45 ± 0,02
WD9.1a	HCl 0,3% (0,09 M)	Diffícil, rasgando	Branco amarelado, pouco uniforme, rugoso, pouco flexível		Dissolveu-se	—*	—	—

origem a reticulação, dado tratar-se de um ácido carboxílico monofuncional, ficando ligado covalentemente ao CS. Os filmes desta formulação apresentaram uma capacidade de inchaço média de 1415 ± 154 % (em PBS) e uma espessura média de 0,31 ± 0,02 mm quando destacados do molde e de 0,45 ± 0,02 mm, quando inchados (Tabela 3.1).

A cor amarelo torrado observada deve-se, possivelmente, à ocorrência da reação de *Maillard* (Figura 3.2) durante o tempo que a formulação se encontrou a 50 °C. A reação de *Maillard* inicia-se pela reação entre grupos aldeído de açúcares redutores e grupos amínicos (Figura 3.2).⁹⁵ No caso desta formulação, estes grupos funcionais pertencem ao próprio CS. Esta reação origina uma imina, que sofre rearranjos estruturais e reações de degradação e

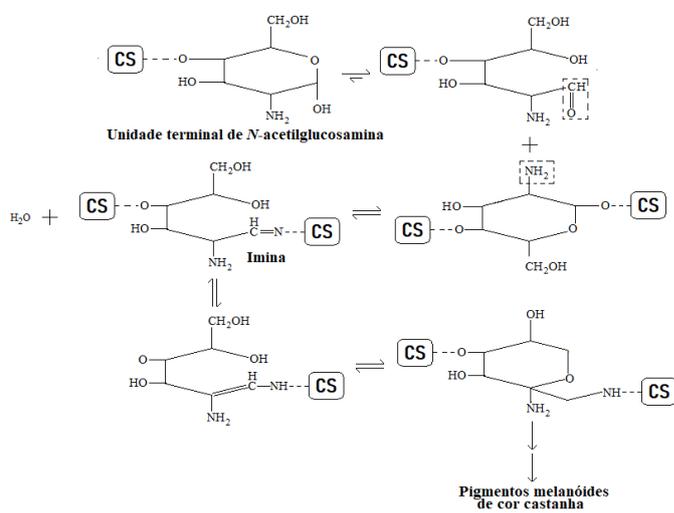


Figura 3.2 – Equilíbrio entre a unidade terminal de *N*-acetilglucosamina na forma de anel fechado e na forma de anel aberto e esquema da reação de *Maillard* que origina pigmentos melanóides de cor castanha a partir da unidade terminal de *N*-acetilglucosamina na forma de anel aberto.

combinação que, ultimamente, resultam na formação de melanoidinas, de cor castanha (Figura 3.2).⁹⁵ Apesar de existir somente um grupo terminal redutor por cadeia de CS, o que limitaria a ocorrência desta reação, durante o tempo que a formulação se encontra a 50 °C, deverá ocorrer alguma quebra da cadeia de CS, por hidrólise da ligação glicosídica, o que aumenta o número

de terminais redutores e o escurecimento do filme. O escurecimento do filme também se pode dever a caramelização¹⁰⁶ que, apesar de ser mais comum com mono- e dissacarídeos, também ocorre com polissacarídeos.⁹⁶

Tendo-se verificado que algumas das características dos filmes desta formulação poderiam ser melhoradas, em particular, a sua resistência ao manuseamento, procurou-se alterar esta formulação. Neste sentido, procurou aumentar-se o grau de reticulação, substituindo o LA a 1% por um ácido mineral, de modo a que a carbodiimida não fosse gasta na reacção com o LA acima referida, uma reacção que não resulta em reticulação. Iniciou-se o estudo com HCl, usando uma concentração de 0,1 mM, de modo a ter-se um pH próximo do da solução de LA, necessário para se dissolver o CS e por, sendo muito baixa, minimizar a possibilidade de hidrólise significativa das ligações glicosídicas do CS. No entanto, surpreendentemente, não se conseguiu dissolver o CS nesta solução, pelo que foram-se adicionando pequenas porções de soluções de HCl mais concentradas até se conseguir dissolver o CS. Isso só sucedeu quando se atingiu uma concentração de 90 mM (ou 0,3%; formulação WD9.1a, Tabelas 2.2 e 3.1). O filme obtido apresentou uma cor branca com um ligeiro tom amarelo, sendo possível cortá-lo em forma de disco. Porém, dissolveu-se quando imerso em água. Este resultado poder-se-á ficar a dever a dois aspectos: (i) ao facto do HCl catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas do CS, causando quebra da cadeia polimérica do quitosano⁹⁷ e/ou (ii) perda da carbodiimida por hidrólise, que é favorável a pH baixo,⁹⁸ não estando disponível para reagir com os grupos carboxílicos do ácido succínico e provocar a reticulação do quitosano, que o insolubiliza.

Em face destes resultados, continuou-se o trabalho com a formulação WD9.1. Após a inversão de fase e reticulação, o filme WD9.1 foi cortado em discos (Figura 3.3), que foram utilizados para se verificar se não se dissolviam em água destilada, à temperatura ambiente, ou em PBS, a 34 °C. O filme da formulação WD9.1 não se dissolveu, nem água destilada nem em PBS (Tabela 3.2). Além disso, o seu diâmetro aumentou significativamente, aumentando mais em água destilada (81%) do que em PBS (38%). Isto acontece porque o inchaço dos hidrogéis com grupos funcionais com cargas eléctricas é tanto maior quanto menor for a força iónica do meio no qual o filme foi imerso⁹⁹, sendo que o PBS tem um força iónica superior à da água destilada.



Figura 3.3 – Discos de 2 cm de diâmetro cortados a partir dos filmes de CS obtidos com a formulação WD9.1 (i) e com a formulação WD9.1a (ii).

Tabela 3.2 – Variação do diâmetro de discos de filmes da formulação WD9.1 após serem colocados em água destilada (T_{amb}) e PBS (34 °C).

Nome	Diâmetro inicial (cm)	Água destilada		PBS	
		Diâmetro após 24 h, T_{amb} (cm)	Variação (%)	Diâmetro após 24 h, 34 °C (cm)	Variação (%)
WD9.1	1,6	2,9	81	2,2	38

Lavagem dos filmes

Durante os ensaios de permeabilidade e de libertação em células de Franz, bem como na quantificação do carregamento de PHMB, recolhem-se amostras do meio para, a partir da sua A_{236} , se determinar a concentração de PHMB. Por esta razão, é necessário garantir que a única substância libertada e que absorve a 236 nm é a PHMB, pelo que os filmes têm de ser bem lavados antes de serem utilizados, já que a formulação possui outras substâncias que absorvem a este comprimento de onda (Figura 3.4). De entre os reagentes utilizados, todos

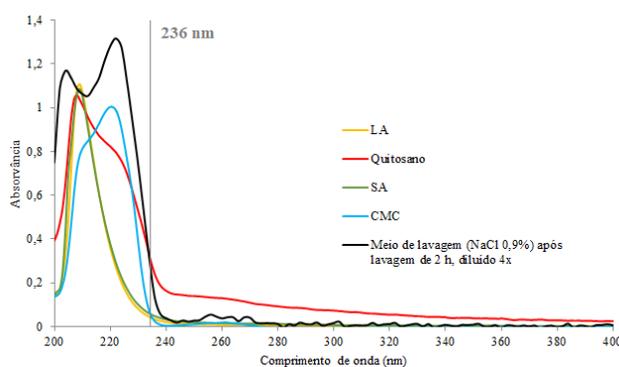


Figura 3.4 – Espectro de absorção dos reagentes utilizados na preparação dos filmes WD9.1, dissolvidos em água destilada (com exceção de CS, que foi dissolvido em LA a 1% (v/v)) e de uma amostra de meio de lavagem retirada após 2 h de lavagem em 50 mL de NaCl 0,9%, a 50 °C (diluída 4×, de modo a não exceder o limite máximo de absorvância do espectrofotómetro).

absorvem a 236 nm, sendo o CS o que mais absorve. Assim, houve necessidade de submeter os filmes WD9.1 a um processo de lavagem rigoroso. Uma possibilidade teria sido uma lavagem num extractor de Soxhlet, utilizando água como solvente. No entanto, uma vez que os discos teriam de ser lavados individualmente porque aderiam uns aos outros, danificando-se quando se tentava separá-los, optou-se por não se usar este método de lavagem, devido ao número elevado de extractores necessário. Além disso, esta extracção ocorreria a uma temperatura elevada (100 °C), que poderia degradar o filme. Assim, optou-se por se seguir o procedimento mencionado na subsecção 2.1.1.

O protocolo de lavagem destes filmes anteriormente desenvolvido, durava 7 dias, uma duração demasiado longa. A lavagem de um primeiro conjunto de filmes utilizados neste estudo foi feita com base nesse protocolo (aqui designado antigo protocolo), mas procedeu-se de forma

diferente para os conjuntos seguintes (Tabela 2.3, secção 2.1.1), de modo a encurtar a sua duração (novo protocolo). Para isso, alterou-se os volumes dos meios de lavagem, a temperatura e a duração de cada etapa. No entanto, como se pretendia seguir o processo de lavagem obtendo espectros do meio de lavagem em cada etapa, não foram utilizados volumes de meio elevados, de modo a que as substâncias lixiviáveis não ficassem demasiado diluídas para serem detectáveis. Também não se pôde começar com um meio que provocasse um inchaço máximo do hidrogel, de modo a facilitar a saída de substâncias lixiviáveis; como o inchaço destes hidrogéis é tanto maior quanto menor for a força iónica do meio de lavagem,⁹⁹ a água desionizada seria o meio indicado. No entanto, em água destilada, o filme de CS inchou demasiado e o diâmetro do recipiente utilizado (copo de 250 mL) não era suficiente para o conter, ficando o filme engelhado. Por outro lado, não era viável usar recipientes maiores, dado o espaço disponível na incubadora. Por esta razão, iniciou-se a lavagem, não com água desionizada, mas com NaCl 0,9% (m/v), a 50 °C. Com este meio, o filme inchou de forma a que as substâncias lixiviáveis pudessem difundir facilmente para o meio, mantendo-se o diâmetro do disco ainda inferior ao diâmetro do recipiente que o continha. Durante o processo de lavagem, passou-se de NaCl 0,9% (m/v) para PBS e reduziu-se a temperatura de 50 °C para 34 °C, de forma a aproximar as condições de lavagem às condições dos ensaios de libertação do fármaco, evitando-se assim que o disco alterasse as suas dimensões quando fosse utilizado nos ensaios de libertação. Quando o espectro das substâncias lixiviáveis já era de intensidade muito reduzida, reduziu-se o volume de meio de lavagem de 50 mL para 10 mL, de modo a que a sua concentração no meio de lavagem não fosse de tal modo baixa que impossibilitasse a sua detecção, uma vez que se pretendia saber quando terminava a sua saída, para assim se dar por concluído o processo de lavagem.

A sequência de espectros das amostras recolhidas ao longo da lavagem seguindo o antigo protocolo, encontra-se representada na Figura 3.5i e a sequência de espectros das amostras recolhidas ao longo da lavagem seguindo o novo protocolo, encontra-se representada na Figura 3.5ii. Em ambos os casos, a maior remoção de substâncias lixiviáveis ocorreu nas duas primeiras etapas. No caso do antigo protocolo, as absorvâncias da primeira fase de lavagem eram superiores às absorvâncias observadas na primeira fase da lavagem com o novo protocolo, por se ter utilizado, no antigo protocolo, um menor volume de meio. Seguidamente, até se conseguir obter um valor de A_{236} dentro dos limites de variabilidade do zero do espectrofotómetro, foi necessário continuar a lavagem até um total de aproximadamente 7 dias, no antigo protocolo de lavagem, e de aproximadamente 2 dias e meio, no novo protocolo de lavagem.

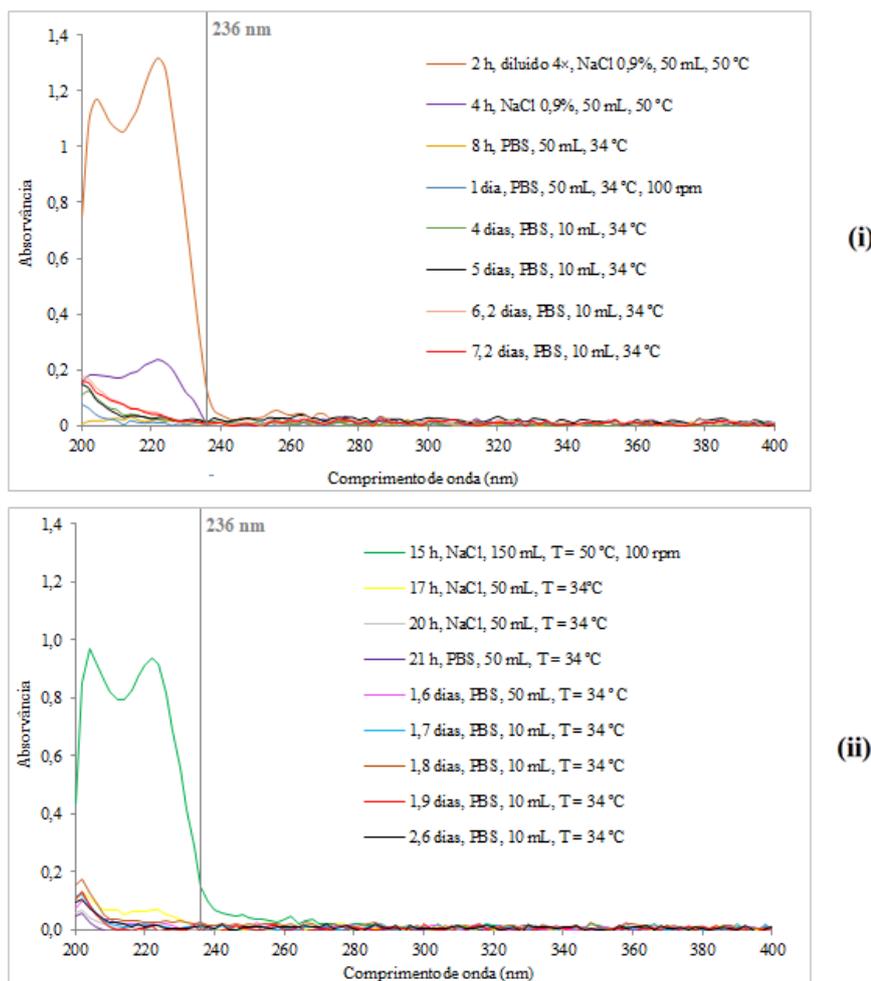


Figura 3.5 – Sequência de espectros das amostras recolhidas ao longo do antigo (i) e do novo (ii) protocolos de lavagem dos discos, com indicação das alterações feitas na solução utilizada como meio de lavagem e seu volume, temperatura e agitação.

Com base nos resultados na Figura 3.5, representou-se a variação da absorvância a 236 nm das amostras recolhida ao longo do processo de lavagem (Figura 3.6). É possível verificar que a maior parte da remoção de reagentes e/ou produtos de reacção que absorvem a 236 nm também ocorre nas duas primeiras etapas da lavagem. Com a troca de meio de lavagem de NaCl 0,9% (m/v) para PBS, continua a remoção, sendo o nível de resíduos libertados bastante mais baixo, ainda que se encontrem diluídos por se estar a usar um volume relativamente elevado.

Como, devido a instabilidade do espectrofotómetro utilizado, a absorvância a 236 nm de uma solução de PBS (branco) oscilava entre 0,000 e 0,011, considerou-se que o processo de lavagem se encontrava concluído quando se obteve, repetidamente, uma absorvância a 236 nm entre estes valores, algo que aconteceu a partir dos 5 dias desde o início da lavagem, utilizando o antigo protocolo de lavagem e 2 dias e 14 h, com o novo protocolo. Apesar de se ter conseguido lavar os filmes em 2 dias e 14 h, esta duração ainda é demasiado longa, necessitando de optimização para que decorra num intervalo de tempo bastante menor.

Durante o processo de lavagem, verificou-se que os discos começaram por aumentar de

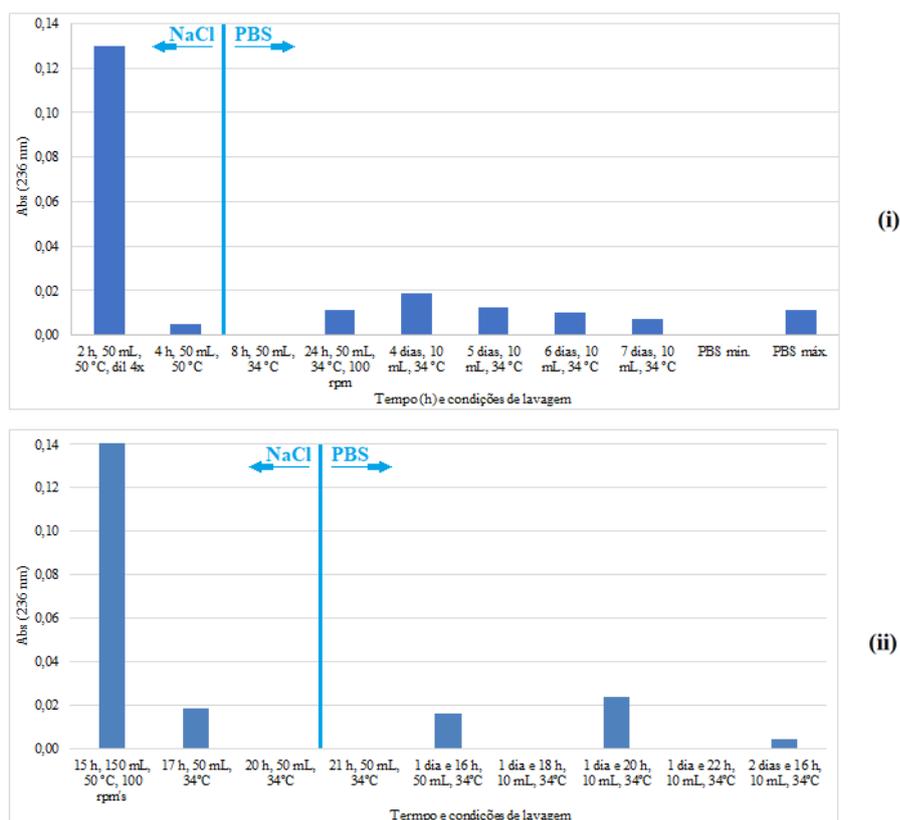


Figura 3.6 – Variação da absorvância a 236 nm de amostras retiradas em cada etapa do processo de lavagem de discos WD9.1 seguindo o antigo (i) e o novo (ii) protocolo de lavagem, com indicação dos diferentes meios (NaCl 0,9% e PBS), volumes e temperaturas. No gráfico (ii), nas 2 últimas colunas, encontra-se representada a variação típica da absorvância a 236 nm de amostras de PBS (branco) que ocorreu durante a medição das absorvâncias representadas em ambos os gráficos. As colunas inexistentes (gráfico (ii), coluna 3 e 9) devem-se a $A_{236} = 0$.

diâmetro, diminuindo em seguida e terminando com um diâmetro ligeiramente superior ao diâmetro inicial. Os discos lavados de acordo com o antigo protocolo de lavagem (Figura 3.7i) que, inicialmente, possuíam um diâmetro de 2,3 cm, sofreram um aumento para 4,1 cm durante as duas etapas de lavagem com NaCl 0,9% (m/v), tendo diminuído para 2,7 cm no final das etapas com PBS. Já os discos lavados de acordo com o novo protocolo (Figura 3.7ii) que, inicialmente, possuíam um diâmetro de 1,65 cm, sofreram um aumento para 3,1 cm durante as duas etapas de lavagem com NaCl 0,9% (m/v), tendo diminuído para 2 cm no final das etapas com PBS. O aumento de diâmetro inicial deve-se à penetração da água no hidrogel, devido à natureza hidrofílica do hidrogel e ao gradiente de força iónica entre o seu interior e o exterior, causando um aumento do seu volume e não se dissolvendo por se encontrar reticulado covalentemente. Como a sua espessura é bastante menor que o diâmetro, este aumento de volume reflete-se maioritariamente num aumento do diâmetro. Quando se passou de NaCl 0,9% (m/v) para PBS, como o PBS tem uma força iónica superior à de uma solução de NaCl 0,9% (m/v) (0,18 M *versus* 0,15 M, respectivamente), ao aumentar a força iónica no meio onde os discos são inseridos, o gradiente de força iónica entre o exterior e o interior diminui, pelo que

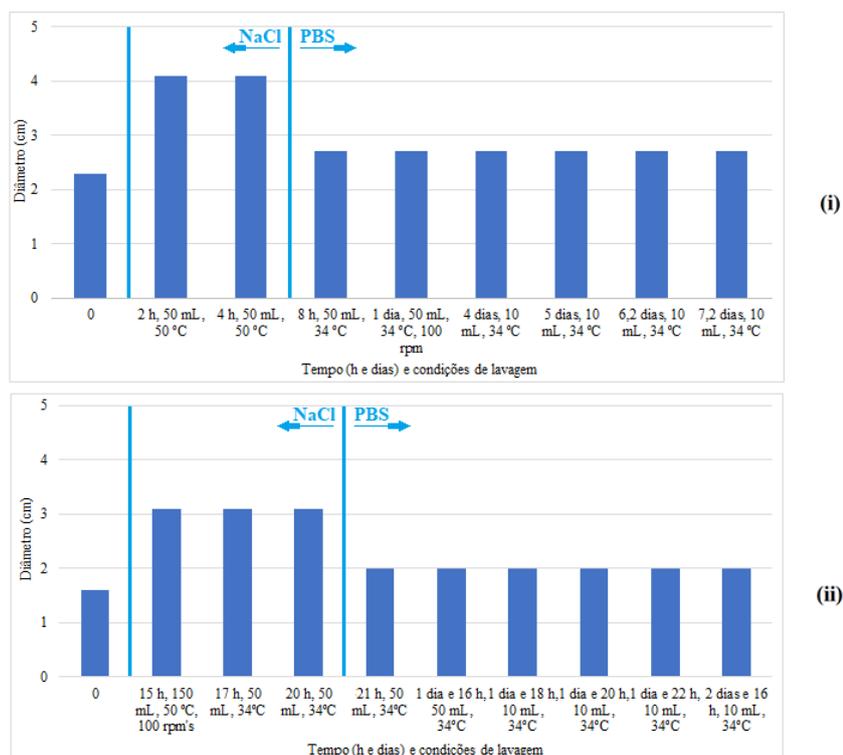


Figura 3.7 – Variação do diâmetro dos discos WD9.1 no final de cada etapa do processo de lavagem dos discos usados nos testes de permeabilidade (i) e nos ensaios de libertação (ii), com diferentes volumes de NaCl a 0,9% e PBS e a diferentes temperaturas.

gera-se uma pressão osmótica que causa um fluxo de água do interior do disco para o exterior, que provoca a diminuição do seu diâmetro.

Espessura dos filmes

A espessura de filmes secos e de filmes inchados em PBS foi medida de forma a conhecê-la e, também, verificar se se conseguia preparar discos que, depois de lavados e inchados, possuíssem uma espessura reprodutível, de modo a que os resultados obtidos nos ensaios de permeabilidade e de libertação sejam comparáveis. Para cada disco, foi calculada a espessura média, a partir de medições feitas em três pontos do disco, tendo-se medido três discos. Começou-se por medir as espessuras de um conjunto de discos cortados a partir de 5 filmes preparados independentemente e que foram lavados e inchados em PBS (grupos I a V, Tabela 3.3). Em seguida, procurou-se saber se, em cada conjunto, as espessuras dos discos que o compunham eram ou não semelhantes. Os resultados obtidos mostram que, em 4 dos 5 grupos, não se encontraram diferenças com significado estatístico mas, num deles (grupo II), encontrou-se uma diferença com significado estatístico ($p < 0.05$). Assim, em geral, existe reprodutibilidade nas espessuras de discos cortados a partir do mesmo filme, lavados e inchados em PBS. Quando se comparou a espessura média dos 5 conjuntos de discos, também não se encontraram diferenças com significado estatístico (Tabela 3.3), indicando que existe reprodutibilidade na espessura de discos com origem em filmes preparados independentemente.

Tabela 3.3 – Avaliação da reprodutibilidade da espessura de 2 ou 3 discos de 1,65 e 2,3 cm de diâmetro, lavados e inchados, cortados a partir de 5 discos de 5 cm de diâmetro também lavados e inchados (grupos I a V).

Grupo de discos (<i>n</i> = 2 ou 3)	Espessura média (mm)	Desvio padrão (mm)	Diferença entre discos do mesmo grupo ¹	Diferença entre grupos ²
I	0,44	0,03	<i>ns</i>	
II	0,45	0,01	*	
III	0,46	0,01	<i>ns</i>	<i>ns</i>
IV	0,44	0,02	<i>ns</i>	
V	0,46	0,02	<i>ns</i>	

¹: *ns* – Diferença não significativa entre as espessuras de discos do mesmo grupo ($p > 0,05$); ANOVA (para $n = 3$) ou teste *t* de Student (para $n = 2$), a um nível de significância de 95%. * – Diferença significativa entre discos do mesmo grupo ($p < 0,05$); ANOVA (para $n = 3$) ou teste *t* de Student (para $n = 2$), a um nível de significância de 95%.

²: *ns* – Diferença não significativa entre as espessuras médias dos 5 grupos de discos ($ns, p > 0,05$); ANOVA, a um nível de significância de 95%.

Uma vez que a PHMB é uma molécula com grupos ionizáveis de carga positiva, poderá alterar a capacidade de inchaço de um hidrogel de CS quando se encontra no seu interior, alterando a espessura dos discos. Assim, procurou-se saber se a presença de PHMB nos discos tinha algum efeito na espessura dos discos. Quando se comparou a espessura média de discos com e sem PHMB (Tabela 3.4), verificou-se que a diferença entre as respectivas espessuras médias não tinha significado estatístico, indicando que a presença de PHMB não teve efeito na espessura dos discos inchados.

Tabela 3.4 – Comparação da espessura de discos lavados e inchados e carregados com PHMB em PBS e discos lavados e inchados em PBS.

Grupo de discos	Espessura média (mm) ¹	Desvio padrão (mm)
Com PHMB em PBS ^a	0,45	0,02
Em PBS ^b	0,46	0,02

^a $n = 10$; ^b $n = 3$.

¹: Diferença não significativa (*ns*) entre as espessuras médias dos 2 tipos de discos ($p > 0,05$); teste *t* de Student, a um nível de significância de 95%.

Como se estudaram discos que foram carregados e autoclavados, procurou-se saber se a autoclavagem tinha algum efeito na espessura dos discos. A espessura média dos discos carregados e autoclavados não apresentou uma diferença com significado estatístico em relação à espessura média de discos carregados e não autoclavados (Tabela 3.5), indicando que a

Tabela 3.5 – Comparação da espessura de discos carregados com PHMB e autoclavados com a espessura de discos carregados com PHMB mas não autoclavados.

Grupo de discos	Espessura média (mm)	Desvio padrão (mm) ¹
Com PHMB, autoclavados ^a	0,44	0,02
Com PHMB, não autoclavados ^b	0,46	0,02

^a $n = 2$; ^b $n = 3$.

¹: Diferença não significativa (*ns*) entre as espessuras médias dos 2 tipos de discos ($p > 0,05$); teste *t* de Student, a um nível de significância de 95%.

autoclavagem não afectou a espessura dos discos. Assim, dado concluir-se que, para o conjunto de discos testado, a espessura dos discos é comparável em todas as situações estudadas, é seguro fazer a comparação entre os resultados dos vários ensaios feitos com diferentes discos.

3.1.2. Filmes de quitosano e alginato

O ALG é um polímero natural biocompatível, com baixa toxicidade, economicamente acessível e capaz de reticular o CS com a ajuda da CMC, pois possui grupos carboxílicos. Estudos publicados relativos ao desenvolvimento de hidrogéis de CS e ALG revelaram filmes possuidores de melhor flexibilidade, resistência mecânica e capacidade inchaço, além de uma libertação de fármaco mais duradoura e melhor controlada.¹⁰⁰ Neste sentido, pretendeu-se preparar filmes de CS e ALG como alternativa aos filmes da formulação WD9.1, de forma a estudar o seu potencial como pensos curativos. As formulações testadas encontram-se na Tabela 2.4 (subsecção 2.1.2) e, os resultados obtidos, na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Resultados da preparação de filmes de CS contendo ALG na formulação (a composição das formulações encontra-se na Tabela 2.4).

Nome	Resultado
WD11	ALG não se dissolveu completamente. Filme obtido era descontínuo e heterogéneo.
WD11.1 WD11.1a	ALG não se dissolveu.
WD11.1c	Ocorreu precipitação após se juntar a solução de CS à de ALG.
WD11.1d WD11.1d1 WD11.1d2 WD11.1d3 WD11.1d4	ALG não se dissolveu.
WD11.1d5 WD11.1d6	Ocorreu precipitação após se juntar a solução de CS à de ALG.
WD11.1b	Ocorreu precipitação após se juntar a solução de CS à de ALG.

A preparação de filmes de CS e ALG teve início na formulação WD11 (Tabela 2.4, subsecção 2.1.2). Esta formulação é idêntica à WD9.1 (Tabela 2.4, subsecção 2.1.2), com a diferença de que se adicionou ALG (5% (m/v)) após a adição de SA. Com esta formulação, embora ainda que não tenha sido possível dissolver a totalidade do ALG, tentou-se obter um filme, algo que foi possível após 24 h a 50 °C. No entanto, o filme resultante era heterogéneo e descontínuo (Tabela 3.6). Uma vez que este filme não possuía as características necessárias, possivelmente devido à existência de ALG por dissolver, tentou-se procurar condições que dissolvessem o ALG na totalidade. Assim, diminuiu-se a concentração de ALG para 1% e retirou-se o SA (WD11.1, Tabela 2.4, subsecção 2.1.2), mas não se conseguiu dissolver o ALG

completamente (Tabela 3.6). Em seguida, procurou-se subir o valor de pH da solução de CS na formulação WD11.1 adicionando NaOH (formulação WD11.1a, Tabela 2.4, subsecção 2.1.2), de modo a facilitar a solubilização de ALG, já que este é mais solúvel para valores de pH elevados,¹⁰¹ mas também não se conseguiu dissolver o ALG (Tabela 3.6). Também não se conseguiu obter uma solução em formulações em que o ALG foi primeiro dissolvido em LA a 1% e só depois adicionado a uma solução de CS em LA a 1%, em diferentes proporções (formulações WD11.1b e WD11.1c, Tabela 2.4, subsecção 2.1.2), tendo ocorrido precipitação durante a adição, nem se conseguiu dissolver o ALG quando se trocou o solvente da formulação WD11.1 (LA) por AA, também a 1% em volume (formulação WD11.1d, Tabela 2.4, subsecção 2.1.2). Explorou-se, ainda, esta formulação com AA, primeiro adicionando-lhe PBS (WD11.1d1, Tabela 2.4, subsecção 2.1.2) de modo a subir o pH e, também, variando a proporção CS/ALG, mas não se conseguiu ter ALG em solução (Tabela 3.6). Por fim, tentou-se a mistura de uma solução de CS em AA (0,5 %) com uma solução de ALG em água destilada, adicionando a 1.^a à 2.^a em diferentes proporções (WD11.1d4, WD11.1d5 e WD11.1d6, Tabela 2.4, subsecção 2.1.2). Ainda que tanto o CS como o ALG se tenham dissolvido nas respectivas soluções, quando se adicionou a solução de CS à de ALG, ocorreu precipitação (Tabela 3.6). Assim, não foi possível preparar filmes de CS/ALG pelo método escolhido e com as formulações testadas, por não se conseguir dissolver o ALG.

3.2. Permeabilidade dos filmes à PHMB

Num ensaio preliminar de libertação de PHMB, concluiu-se que a velocidade de libertação de PHMB a partir de filmes de CS era demasiado elevada para o uso que se lhes pretende dar. Sendo a PHMB um polímero e, por isso, de tamanho superior ao dos fármacos típicos, poderá ter dificuldade em penetrar na malha polimérica dos discos, limitando-se às camadas superficiais. Adicionalmente, como tanto a PHMB como o CS possuem carga eléctrica positiva e, apesar do carregamento ser feito numa solução que contém sais dissolvidos (PBS), que possuem o potencial de neutralizar a repulsão eléctrica entre moléculas (*screening*), a concentração de sais poderá ser insuficiente para este efeito e poderá haver dificuldade na penetração da PHMB. Assim, procurou-se verificar se a PHMB era capaz de atravessar discos WD9.1. Neste estudo, utilizaram-se discos sem PHMB, montados em células de difusão de Franz que continham uma solução de PHMB na câmara dadora e PBS na câmara receptora (Figura 2.2, secção 2.5) e representou-se a evolução no tempo da massa total de PHMB que atravessou o disco e se acumulou na câmara receptora da célula. Foram feitos ensaios com duas concentrações de PHMB diferentes, com o intuito de confirmar que os resultados que

indicariam que a PHMB atravessava o filme não surgiam por a PHMB ter passado para a câmara receptora através de um qualquer caminho que não implicasse a travessia do filme (fuga), já que a difusão através do disco aumentaria com a concentração de PHMB na câmara dadora. Como se pode observar na Figura 3.8, ambas as curvas apresentaram um perfil linear nas primeiras 3 horas. A partir desta parte das curvas, que corresponde a um estado estacionário, calculou-se o fluxo no estado estacionário de PHMB através do disco (J_{SS}) e o coeficiente de permeabilidade da PHMB através do disco (P), obteve-se o tempo de latência (t_L) e, a partir deste, calculou-se o coeficiente de difusão da PHMB através do disco (D), parâmetros apresentados na Tabela 3.7. Os valores de J_{SS} , P e D , aumentaram com a concentração de PHMB, enquanto que t_L diminuiu, significando que a PHMB atravessa o disco mais rapidamente quando a sua concentração é mais elevada, tal como seria de esperar. Assim, pode afirmar-se que a molécula de PHMB conseguiu difundir através dos discos ensaiados.

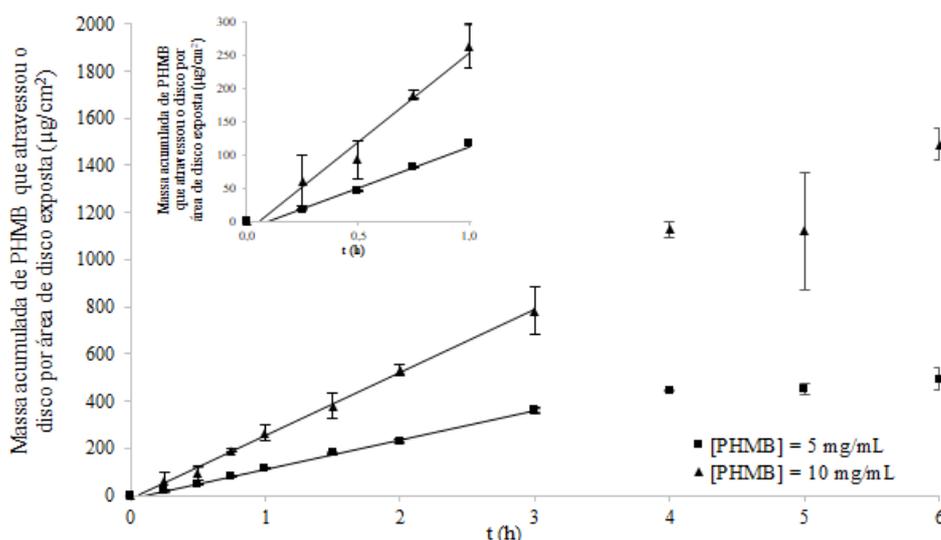


Figura 3.8 – Massa de PHMB acumulada que atravessou o disco de CS ao longo do tempo, a 34 °C, numa célula de Franz de 14,5 mL, utilizando uma solução de 5 mg/mL de PHMB em PBS ($n = 2$) e uma solução de 10 mg/mL de PHMB em PBS ($n = 3$). As linhas representam a regressão linear feita com os pontos na fase linear inicial (estado estacionário). As barras de erro representam o desvio padrão de cada ponto. O gráfico menor é uma ampliação da 1.ª hora do ensaio que permite melhor visualizar o t_L de ambos os estudos.

Tabela 3.7 – Fluxo no estado estacionário (J_{SS}), coeficiente de permeabilidade (P), tempo de latência (t_L) e coeficiente de difusão (D) de PHMB através do disco, obtidos nos ensaios de permeabilidade com soluções de PHMB de 5 e 10 mg/mL em PBS.

Concentração da solução de PHMB	5 mg/mL	10 mg/mL
J_{SS} (µg/cm²/h)	124	268
P (cm/h)	0,02	0,03
t_L (min)	5,5	3,3
D (cm²/s)	9×10^{-7}	1×10^{-6}

Não tendo sido encontrado qualquer relato na literatura em que fosse calculado o coeficiente de difusão da PHMB em PBS, noutra solução aquosa ou em água, ou algum dos outros parâmetros calculados neste estudo, de modo a perceber se os valores obtidos para estes parâmetros eram válidos, procurou-se compará-los com o de uma molécula com alguma semelhança com a PHMB. Selecionou-se a protamina, uma proteína predominantemente composta por arginina e, como tal, com carga eléctrica positiva e com peso molecular típico de cerca de 4500 g/mol,¹⁰² um valor próximo do limite superior do intervalo de valores para a PHMB (entre 700 a 4200 g/mL).⁶⁵ O coeficiente de difusão da protamina (em LiCl 10 mM) é de $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (¹⁰³), sendo da mesma ordem de grandeza dos valores do coeficiente de difusão obtidos no ensaio de permeabilidade, parecendo validar os resultados obtidos. No entanto, é preciso ter em conta que, apesar da semelhança com a PHMB, a protamina poderá ter dimensões e conformação diferentes da PHMB em solução e o valor do coeficiente de difusão da protamina resulta de um estudo eletroquímico efectuado numa solução de LiCl 0,01 M.

3.3. Carregamento e libertação de PHMB

3.3.1. Carregamento de PHMB em filmes WD9.1 por imersão

Como mencionado na subsecção 2.7.1, um dos tipos de carregamento de PHMB em filmes WD9.1 foi o carregamento por imersão, em que se submergiram os filmes na forma de disco numa solução de PHMB e, por diferença entre a massa de fármaco presente na solução antes e depois do carregamento, determinou-se a capacidade de carregamento de PHMB no filme. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.8. Só se conseguiu obter resultados com um dos discos e, com esse, o rendimento de carregamento foi somente de 1% em relação à massa de PHMB presente na solução, tratando-se de um rendimento de carregamento muito baixo. Este resultado pode ficar a dever-se ao facto de se ter optado por fazer o carregamento na presença de um grande excesso de PHMB, de modo a procurar fazê-lo em condições que proporcionassem um carregamento máximo. Nestas condições, pode não conseguir detectar-se

Tabela 3.8 – Massa carregada e rendimento de carregamento de PHMB nos discos WD9.1, por imersão numa solução de 5 mg de PHMB/mL de PBS, durante 24 h a 34 °C, sob agitação a 100 rpm.

Disco	Massa de PHMB carregada		Rendimento de carregamento (%)
	(µg de PHMB/mg disco seco)	(µg de PHMB/cm ²)	
1	2	67	1
2	—*	—*	—*
3	—*	—*	—*

* Não determinado pois não se obteve diferença entre a massa de PHMB presente na solução de carregamento antes e depois do carregamento.

diferença entre a massa de PHMB presente na solução de carregamento antes e depois do carregamento, já que, existindo um grande excesso de PHMB, poderá não se conseguir detectar a reduzida massa de PHMB que entrou no disco. Tudo indica ser este o caso já que, os dois discos em que não se encontrou diferença entre a massa de PHMB antes e depois do carregamento (discos 2 e 3), quando ensaiados, libertaram PHMB.

3.3.2. Carregamento de PHMB em filmes WD9.1 por imersão e autoclavagem

De forma a evitar que, ao serem usados como pensos curativos, os filmes de CS sejam um veículo para algum tipo de infeção, os pensos curativos devem ser preparados em condições assépticas ou submetidos a um processo de esterilização terminal. No entanto, o processo de esterilização não pode danificar o filme ou o fármaco, nem alterar desfavoravelmente a cinética de libertação do fármaco. Desta forma, utilizou-se a autoclavagem como método de esterilização terminal, por ser um método utilizado em pensos curativos e por se saber que o fármaco utilizado era termicamente resistente.⁵⁹ Como a quantidade de fármaco carregado por imersão aumentaria quando se aumenta a temperatura a que o carregamento ocorre, se a temperatura for o único factor a afectar significativamente o coeficiente de difusão do fármaco, aproveitou-se a autoclavagem para, em simultâneo, se proceder ao carregamento da PHMB, levando a cabo a autoclavagem com o disco imerso numa solução de PHMB.

Começou-se por investigar de que forma a autoclavagem afetava o aspecto visual dos discos WD9.1. Foram autoclavados discos a seco, na presença de PBS e na presença de uma solução de 10 mg/mL de PHMB em PBS. A Figura 3.9 mostra o aspecto dos discos autoclavados (discos 2 a 4) e de um disco mantido à temperatura ambiente (disco 1). Os discos autoclavados em PBS e na solução de PHMB apresentavam-se ligeiramente enrolados. No entanto, exibiam uma flexibilidade suficiente para voltarem a ficar planos, sendo possível montá-los em células de difusão de Franz. Apresentavam uma cor amarelada, mais escura do



Figura 3.9 – Fotografias de discos WD9.1 após a autoclavagem. 1- Disco não autoclavado e mantido à temperatura ambiente. 2- Disco autoclavado a seco. 3- Disco autoclavado imerso em PBS. 4- Disco autoclavado imerso numa solução de PHMB em PBS.

que a de discos não autoclavados. Já o disco autoclavado a seco apresentava-se castanho escuro, indicativo de que sofreu forte degradação térmica. O escurecimento dos discos após autoclavagem pode ser devido à ocorrência da reação de Maillard, já referida na subsecção 3.1.1.⁷⁶ No caso dos filmes de CS que sofreram autoclavagem a seco, para além da ocorrência

da reacção de *Maillard*, é possível que ocorra degradação por despolimerização da cadeia de CS e reticulação intermolecular envolvendo grupos amínicos.⁹⁵ Assim, os discos WD9.1 não poderão ser autoclavados a seco, tendo de ser autoclavados em solução aquosa, o que possibilita o carregamento da PHMB durante a autoclavagem.

3.3.3. Análise termogravimétrica dos filmes autoclavados

O objetivo desta análise por TGA foi de apurar o efeito da esterilização em autoclave sobre filmes de CS, em particular, sobre a sua estabilidade térmica, uma vez que a esterilização ocorre a uma temperatura elevada (121 °C). Pretendeu-se, também, saber se a presença de PHMB teria algum papel nalgum efeito detectado. Para isso, os termogramas de amostras esterilizadas em PBS e numa solução de PHMB em PBS foram comparados entre si e com o do filme não esterilizado, assim como com resultados reportados noutros estudos, de forma a também se perceber se os resultados da análise térmica eram ou não concordantes com os de outros estudos.

Os resultados da análise térmica foram representados na forma de dois termogramas (Figura 3.10): (i) o de TGA, que representa a perda de massa (m) ocorrida quando se variou a temperatura (T); e (ii) o de DTG, que representa a primeira derivada em relação à temperatura da curva do termograma de TGA (dm/dT , Figura 3.10). Os valores das temperaturas de início da transição principal (T_2^i), de fim da transição principal (T_2^f) e da temperatura correspondente ao ponto de inflexão na curva de DTG, correspondente ao ponto de perda máxima de massa na curva de TGA (T_2^{max}), encontram-se apresentados na Tabela 3.9.

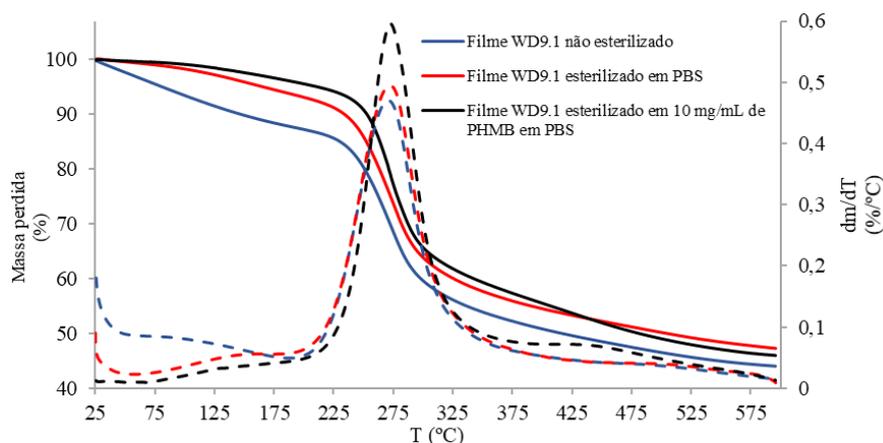


Figura 3.10 – Termogramas de TGA (linhas contínuas) e de DTG (linhas a ponteadas) de filmes WD9.1 não esterilizados, esterilizados em PBS e esterilizados numa solução de 10 mg/mL de PHMB em PBS.

Como se pode observar na Figura 3.10, as três curvas de TGA são semelhantes e, em todas elas, a transição principal, correspondente à maior perda de massa, inicia-se entre 244 e 254 °C, devendo-se à degradação térmica do filme. A T_2^i do filme não esterilizado foi idêntica

Tabela 3.9 – Temperatura inicial da transição principal (T_2^i), temperatura final da transição principal (T_2^f), temperatura da perda máxima de massa (T_2^{\max}), percentagem de massa perdida na transição principal e percentagem de massa total perdida, identificadas na análise por TGA/DTG de filmes WD9.1 não esterilizados, esterilizados em PBS e esterilizados numa solução de PHMB em PBS.

Filme	T_2^i (°C)	T_2^{\max} (°C)	T_2^f (°C)	Perda de massa da transição principal (%)	Perda de massa total (%)
Não esterilizado	244	273	300	38	56
Esterilizado em PBS	245	276	302	42	53
Esterilizado em 10 mg/mL de PHMB em PBS	254	272	294	39	54

à do filme esterilizado em PBS (244 °C e 245 °C, respetivamente), mas o filme esterilizado em PHMB apresentou uma T_2^i superior à dos restantes em cerca de 10 °C (254 °C). A T_2^{\max} foi semelhante para os filmes não esterilizado e esterilizado em solução de PHMB (273 °C e 272 °C, respetivamente), sendo ligeiramente superior no caso do filme esterilizado em PBS (276 °C). As T_2^f do filme não esterilizado e do filme esterilizado em PBS foram também semelhantes (300 e 302 °C, respetivamente), sendo a do filme esterilizado em PHMB inferior (294 °C). Posto isto, verifica-se que a presença de solução de PHMB em PBS durante a esterilização resulta num valor de T_2^i que é cerca de 10 °C superior ao dos casos em que os filmes não foram esterilizados ou foram esterilizados na presença de PBS, sugerindo que a presença de PHMB tem um efeito estabilizador. Este efeito poderá ocorrer por interação entre a PHMB e as cadeias poliméricas do filme, uma vez que ambos possuem a capacidade de interação através de ligações de hidrogénio. É, assim, vantajoso efectuar a esterilização na presença da solução de PHMB, o que ocorre quando se efectua o carregamento dos discos durante a autoclavagem.

É possível, ainda, observar que ocorre alguma perda de massa antes de ocorrer a degradação principal. Esta perda inicial começa quase imediatamente após o início do teste, no caso do filme não esterilizado, mas começa apenas por volta dos 100 °C no caso dos filmes esterilizados em PBS e em solução de PHMB, tal como sucede com outros estudos na literatura comparáveis (Anexo I, Tabela AII.1), devendo-se, essencialmente, à evaporação de água residual adsorvida⁷⁶ e de algum LA residual (ponto de ebulição: 122 °C). No caso do filme não esterilizado, a perda de massa começa logo no início do termograma, contrariamente aos filmes esterilizados, o que poderá ser explicado pelo facto do filme não esterilizado não ter sido submetido à extracção em meio aquoso que ocorrerá durante o processo de autoclavagem. Esta extracção resultará em perda de massa da amostra por remoção de excesso de reagentes e por alguma solubilização, podendo ter também ocorrido perda de LA residual por volatilização, ainda que todas as amostras usadas na análise por TGA, incluindo a amostra que não sofreu esterilização, tenham sido sujeitas a um detalhado processo de lavagem antes da esterilização

(subsecção 2.1.1).

O filme não esterilizado apresentou valores de T_2^i , T_2^{\max} e T_2^f semelhantes ao que se encontrou na literatura (Anexo I, Tabela AII.1). Quanto aos dois filmes esterilizados, não foi possível comparar os resultados obtidos com a literatura, pois não se encontrou qualquer trabalho no qual se tenha feito uma análise de TGA a filmes à base de CS que tenham sido submetidos a esterilização por autoclavagem.

A percentagem de massa perdida durante a transição principal foi semelhante nos três casos, com valores de 38% e 39% para os filmes não esterilizado e esterilizado na solução de PHMB em PBS, respectivamente, apresentando o filme esterilizado em PBS um valor ligeiramente superior (42%). Já no que diz respeito à percentagem total de massa perdida, ela foi superior no caso do filme não esterilizado (56%) e semelhante entre si no caso dos filmes esterilizados em PBS e na solução de PHMB (53 e 54%, respectivamente), indicando uma perda de massa ligeiramente inferior devido à degradação térmica quando na presença de PBS ou de PHMB em PBS. Isto indica que a esterilização destes filmes não afeta significativamente a perda de massa da transição correspondente à degradação do CS e que diminui a massa total perdida. Tal poderá ser explicado pelo facto do filme não esterilizado, não tendo sido submetido ao processo de esterilização por autoclavagem, não sofreu o processo de extracção em meio aquoso atrás referido, ainda que todas as amostras usadas na análise por TGA tenham sido sujeitas a um detalhado processo de lavagem (subsecção 2.1.1). A percentagem de massa perdida na transição principal do filme não esterilizado foi idêntica ao relatado na literatura, enquanto que a perda de massa total deste filme foi inferior (Anexo I, Tabela AII.1). A perda de massa da transição principal e a perda de massa total dos filmes esterilizados não foram comparadas com a literatura por não se ter encontrado qualquer trabalho em que se tenham estudado por TGA filmes à base de CS autoclavados.

Caso a PHMB se encontrasse presente no interior do filme esterilizado numa solução de PHMB em PBS, poderia ser possível detectar a sua presença por TGA, uma vez que as temperaturas das transições térmicas de PHMB (200 – 210 °C, 240 °C e 360 °C, 473 °C e 520 °C)^{59,86} não ocorrem no intervalo em que ocorre a transição principal do filme esterilizado (245 – 302 °C). No entanto, não se conseguiu detectar, podendo isso ficar a dever-se a não ter penetrado no filme em quantidade suficiente para a sua detecção por TGA.

3.3.4. Carregamento de PHMB por adição à formulação WD9.1

Como os resultados obtidos que a seguir serão apresentados (subsecção 3.3.5) indicaram que se está longe de ter uma libertação de PHMB que dure cerca de 2 dias (a frequência de troca de pensos curativos comerciais com PHMB)⁷³ e, como na subsecção 3.5.1. não se conseguiu

quantificar o carregamento de fármaco em todos os discos, estes resultados levam a crer que a quantidade de fármaco carregado poderá ser insuficiente para o pretendido. Como já referido (secção 3.2), poderá haver dificuldade na penetração da PHMB na malha do filme de quitosano reticulado, o que terá como consequência um baixo carregamento de PHMB, limitando-se a sua presença à superfície do filme e pouco abaixo dela. Se assim for, a PHMB também se libertará muito rapidamente. De modo a procurar resolver esta hipotética dificuldade de penetração da PHMB no filme e conseguir ter PHMB distribuída em toda a espessura do filme, carregaram-se os filmes com PHMB adicionando PHMB à formulação antes da formação do filme, dissolvendo-a juntamente com os componentes da formulação. Para isso, adicionou-se a PHMB à formulação WD9.1, seguindo o procedimento mencionado na subsecção 2.1.1 para a preparação da formulação WD9.1 e respectivos filmes, e cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.10. Esta adição da PHMB ocorreu em momentos diferentes da preparação e em diferentes concentrações (Tabela 2.5, subsecção 2.7.2) de modo a permitir a ocorrência de reticulação antes da adição da PHMB. Quando a PHMB foi adicionada após a adição de todos os componentes, dissolveu-se sempre, excepto quando se encontrava na concentração mais elevada (20% em massa, em relação à massa de CS), sendo sempre possível obter filmes com características promissoras. No entanto, contrariamente ao que sucedia com os filmes resultantes da formulação WD9.1, estes filmes dissolviam-se em PBS, a 34 °C (formulações WD9.1_5, WD9.1_10, WD9.1_20 e WD9.1_20a2, Tabela 2.5, subsecção 2.7.2), implicando que a reacção de reticulação não ocorreu em grande extensão. Esta falha na reticulação é explicável atendendo a que a PHMB possui grupos =NH, que são capazes de reagir com os

Tabela 3.10 – Características de filmes com PHMB na formulação, após retirada do respetivo molde.

Nome	Ácido usado na formulação (% , v/v)	Remoção do molde	Características dos filmes	Fotografia	Solubilidade	
					H ₂ O; T _{amb}	PBS; 34 °C
WD9.1_5		_*	_*	_*	Solúvel	Solúvel
WD9.1_5a1		_*	_*	_*	Solúvel	Solúvel
WD9.1_10	LA, 1%	_*	_*	_*	Solúvel	Solúvel
WD9.1_10a1		_*	_*	_*	Solúvel	Solúvel
WD9.1_20		_*	_*	_*	Insolúvel	Solúvel
WD9.1_20a2		_*	_*	_*	Solúvel	Solúvel
WD9.4_10a1	AA, 1%	Fácil.	Amarelo torrado, pouco uniforme, rugoso e flexível.	 **	Insolúvel	Insolúvel
WD9.5_10a1	HCl, 0,3%	Alguma dificuldade em retirar.	Branco, pouco uniforme, rugoso e flexível.		Solúvel	_*
WD9.5.1_10a1	HCl, 0,2%	Fácil.	Branco, uniforme, rugoso e flexível.		Insolúvel	Insolúvel

* Não se testou.

** Por lapso, não se possui fotografia do filme após a sua retirada do molde. A fotografia apresentada é de um disco cortado a partir do filme obtido.

grupos carboxílicos activados pela CMC,⁴⁵ competindo com os grupos amínicos do quitosano, encontrando-se a PHMB em grande excesso. Assim, de modo a evitar esta competição, adicionou-se PHMB somente após deixar a carbodiimida reagir durante diferentes intervalos de tempo e, assim, permitir a ocorrência da reticulação do CS através do SA. Nesta tentativa, conseguiu-se dissolver a PHMB e obter filmes, mas os filmes obtidos continuaram a dissolver-se em PBS (formulações WD9.1_5a1, WD9.1_10a1, WD9.4_10a1, WD9.5_10a1 e WD9.5.1_10a1, Tabela 2.5, subsecção 2.7.2).

De modo a procurar encontrar uma solução para a dissolução dos filmes contendo PHMB, procurou usar-se outro ácido na formulação, de modo a que o valor de pH da formulação fosse mais próximo do valor mais favorável à activação de grupos carboxílicos pela CMC e a subsequente reacção destes com grupos amínicos (pH entre 4 e 6),⁴⁵ continuando a adicionar-se a PHMB somente após deixar a carbodiimida reagir durante algum tempo. Além disso, diminui-se a perda da CMC por hidrólise, já que esta é tanto mais extensa quanto mais baixo for o pH.⁹⁸ Quando o LA a 1% em volume foi substituído por AA a 1% (formulação WD9.4_10a1), obteve-se um filme promissor, que não se dissolveu nem em água, nem em PBS a 34 °C. Já quando se substituiu o LA por HCl, um ácido que não é carboxílico e como tal não reage com a CMC, a 0,3% em volume (0,085 M), o filme resultante (WD9.5_10a) não foi tão fácil de remover do molde, apresentou-se pouco uniforme e dissolveu-se em água (Tabela 2.5, subsecção 2.7.2). Tal como mencionado na subsecção 3.1.1 para o caso da WD9.1a, a concentração de HCl (0,09 M) para a preparação do filme WD9.5_10a1 foi escolhida de modo a ter-se um pH próximo do da solução de LA, necessário para se dissolver o CS, mas que minimizasse a possibilidade de hidrólise significativa das ligações glicosídicas do CS. Neste caso, o filme poder-se-á ter dissolvido devido a hidrólise das ligações glicosídicas do CS, catalisada pelo HCl, e/ou devido à destruição da CMC por hidrólise, que ocorre a pH baixo, não ocorrendo reticulação significativa, ou hidrólise da ligação amida responsável pela reticulação do CS. Procurou-se, ainda, baixar a concentração da solução de HCl de modo a diminuir a extensão de hidrólise do CS e da CMC, de modo a ainda conseguir dissolver o CS, tendo-se baixado para 0,2% (0,07 M). O filme resultante (WD9.5.1_10a1) apresentou características promissoras e não se dissolveu nem em água, nem em PBS. Assim, conseguiu-se preparar filmes contendo PHMB que não se dissolviam nem em água, nem em PBS, a 34 °C, utilizando soluções de AA a 1% em volume e HCl a 0,3% em volume como solventes (formulações WD9.4_10a1 e WD9.5.1_10a1).

3.3.5. Caracterização da libertação de PHMB

É pretendido que a PHMB carregada nos discos de CS não seja libertada toda de uma só vez, de forma a que os filmes de CS preparados sejam viáveis como pensos curativos, libertando PHMB de forma controlada durante cerca de 2 dias, atendendo à periodicidade de troca mais comum de pensos curativos que libertam PHMB (secção 1.7), e acima da concentração correspondente à MIC90 para as espécies bacterianas mais comuns em feridas (secção 1.7). O estudo da libertação da PHMB a partir de filmes preparados por carregamento em imersão foram levados a cabo em células de Franz, segundo o procedimento mencionado na secção 2.8, tendo como objetivo estudar a cinética de libertação da PHMB e assim perceber quais as formulações que permitem obter discos que libertem o fármaco da forma pretendida. Como a câmara dadora das células de Franz se encontra vazia, foi colocado um disco de PVC transparente sobre o disco a ensaiar, de modo a não se perder solução recetora para a câmara dadora, através do disco a ser ensaiado, algo que sucedia na ausência deste 2.º disco. Os resultados obtidos foram representados na forma de um gráfico que relaciona a massa acumulada de PHMB por área de disco exposta ao meio com o tempo decorrido, com o objetivo de se perceber qual a duração da libertação de PHMB e qual a quantidade máxima libertada.

Inicialmente foi feito um ensaio preliminar utilizando discos WD9.1 secos de 1,2 cm de diâmetro e células de Franz de 5,3 mL (Figura 3.11 i). Neste ensaio, os discos foram carregados por imersão numa solução de PHMB a 5 mg/mL em PBS, durante 24 h, a 34 °C e sob agitação. A curva obtida apresentou-se irregular e com réplicas com fraca reprodutibilidade, apresentando barras de erro de dimensão considerável. Esta fraca reprodutibilidade foi inesperada, dada a boa reprodutibilidade nas espessuras dos discos inchados. Também se

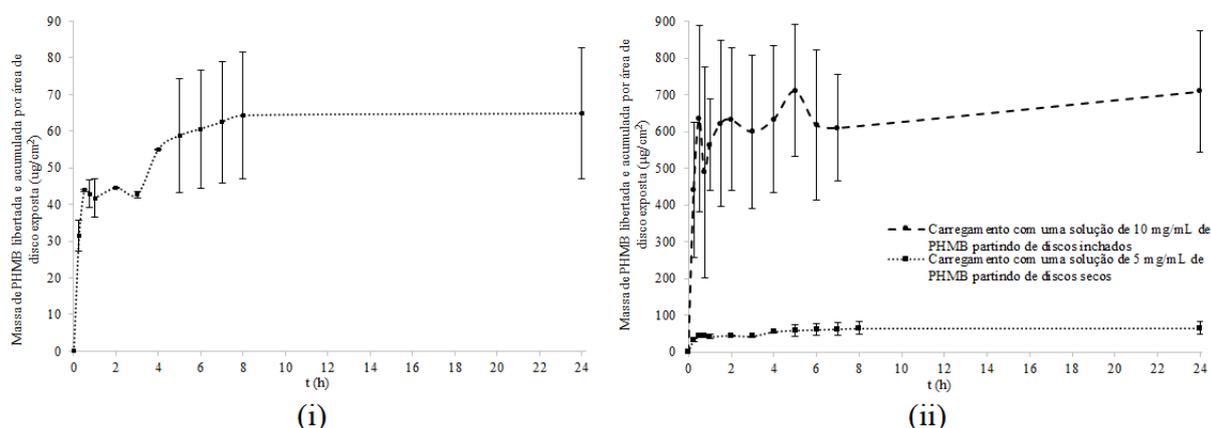


Figura 3.11 – Massa de PHMB libertada pelo disco de CS e acumulada ao longo do tempo, numa célula de Franz com PBS a pH 7,4 e a 34 °C, com um carregamento feito com discos secos, por imersão numa solução de 5 mg/mL de PHMB em PBS ($n = 2$), durante 24 h, a 34 °C, sob agitação (i), e comparação entre a curva representada em (i) e a curva de libertação de discos pré-inchados em PBS e carregados por imersão numa solução de 10 mg/mL de PHMB em PBS durante 24 h, a 34 °C e sob agitação ($n = 2$) (ii). As barras de erro representam o desvio padrão de cada ponto.

observa que a libertação de PHMB foi muito rápida, sendo difícil indicar a duração da libertação, dada a irregularidade da curva (3 – 4 h). Nos primeiros 15 min, libertou entre 50 e 60% da quantidade de fármaco que libertou quando se atingiu o estado de equilíbrio, que foi de aproximadamente 64 μg de PHMB/ cm^2 de área do disco (a concentração de PHMB na câmara dadora quando se atingiu o equilíbrio foi de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Uma possível explicação para esta rápida libertação poderá ser a dificuldade de penetração da PHMB na malha reticulada do filme, encontrando-se presente somente à superfície do filme e camadas mais próximas da superfície.

Como, neste ensaio, o carregamento foi iniciado com discos secos, procurou-se aumentar a quantidade de PHMB carregada e libertada iniciando o carregamento com discos já inchados em PBS e aumentando a concentração de PHMB de 5 para 10 mg/mL , mantendo as restantes condições do carregamento. A curva de libertação obtida (Figura 3.11ii) também se apresentou irregular e com fraca reprodutibilidade nas réplicas. A libertação de PHMB foi novamente muito rápida, libertando-se entre 60 e 65% nos primeiros 15 minutos. Apesar de ser difícil indicar a duração da libertação, devido à irregularidade da curva, esta deverá ser entre 1 e 2 h. A quantidade de fármaco libertada quando se atingiu o equilíbrio (630 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondente a ~ 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi quase 10 \times superior ao caso de discos secos carregados em 5 mg/mL de PHMB, o que pode ser explicado pela concentração mais elevada da solução de carregamento e a se ter iniciado o carregamento com discos pré-inchados.

No estado de equilíbrio, as concentrações de PHMB acumuladas eram de ~ 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no caso do carregamento com discos secos e de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no caso do carregamento com discos pré-inchados. Assim, o carregamento com discos pré-inchados e utilizando uma concentração de PHMB superior aparenta ser melhor do que o carregamento de discos secos e com uma menor concentração de PHMB, pois a quantidade de PHMB libertada é superior, embora a duração da libertação com discos secos pareça ser maior. Além disso, não se sabe se a quantidade de PHMB libertada por qualquer dos dois tipos de carregamento é suficiente para o fim pretendido, pois não se pode comparar com o valor da MIC90 deste agente antisséptico para as principais espécies bacterianas presentes em feridas, dado o volume de meio usado nos ensaios ser muito superior ao do exsudato de uma ferida (entre 0,6 e 2,8 mL/cm^2 de área de ferida/dia).⁶⁹ Por outro lado, os ensaios foram feitos em condições de *infinite sink*, em que o fármaco que é libertado não encontra barreiras à sua dissolução no meio, o que não acontece numa ferida: devido ao seu reduzido volume e baixa taxa de renovação, o exsudato cedo ficará saturado com PHMB, a concentração de PHMB libertada poderá ser superior à concentração atingida nos ensaios em células de Franz e a duração da libertação poderá ser superior. No entanto, a duração de libertação obtida com estes discos foi muito inferior aos 2 dias que se

pretendia (a frequência de troca de pensos curativos comerciais com PHMB), ou mesmo a 24 h, admitindo uma troca de penso diária.

Os pensos curativos deverão apresentar-se estéreis, uma vez que não devem ser um veículo para algum tipo de infecção. No entanto, o processo de esterilização, para além de poder causar danos no filme que compõe o penso e poder degradar o fármaco, pode alterar a cinética de libertação do fármaco. Como a PHMB é termicamente estável⁵⁹ e como a perda de massa total de um filme WD9.1 que ocorre no TGA é ligeiramente inferior quando autoclavado do que quando não autoclavado (Tabela 3.9, subsecção 3.3.3), utilizou-se a autoclavagem como método de esterilização, procurando verificar se a cinética de libertação era afectada pela autoclavagem. Para isso, estudaram-se três tipos de discos: (i) discos pré-inchados e carregados com PHMB a 10 mg/mL em PBS, numa incubadora a 100 rpm e 34 °C, durante 24 h, (ii) discos pré-inchados e autoclavados na presença de uma solução de PHMB 10 mg/mL em PBS (isto é, carregados durante um ciclo de autoclavagem com a duração de 22 min a 121 °C e 1,4 atm, com uma duração total do processo de 80 min) e deixados durante mais 24 h, à T_{amb} ; (iii) discos pré-inchados, não autoclavados e não carregados (branco). Os ensaios de libertação (Figura 3.12) revelaram novamente irregularidade na curva e grande variabilidade nas réplicas. Os discos libertaram grande parte da PHMB na primeira meia-hora (entre 60 a 65%, nos primeiros 15 min) e, a partir dos 30 min, as curvas apresentaram-se irregulares, até atingirem um *plateau*.

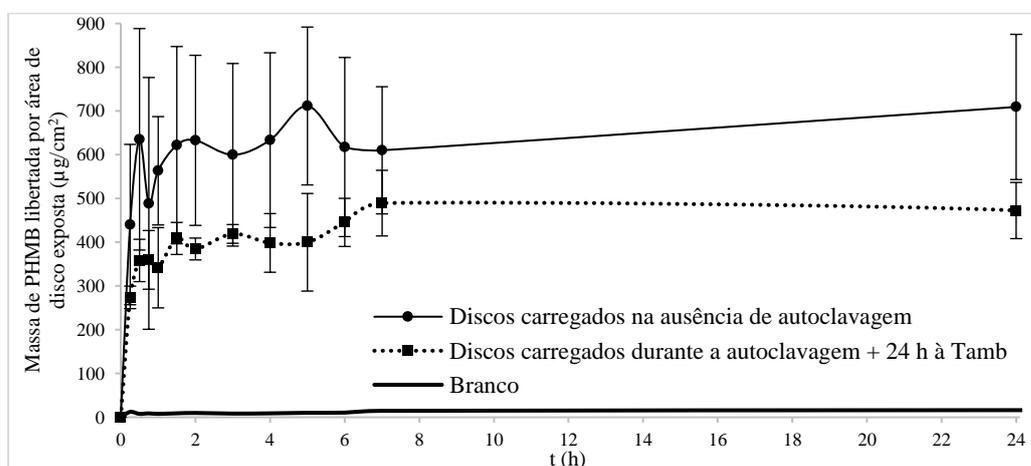


Figura 3.12 – Massa de PHMB libertada e acumulada pelo disco de CS ao longo do tempo, a 34 °C, numa célula de Franz com 14,5 mL de PBS, utilizando discos não autoclavados ($n = 2$, linha a tracejado)), discos carregados com PHMB a 10 mg/mL em PBS durante a autoclavagem e durante 24 h à T_{amb} ($n = 3$; linha a pontilhado) e discos não carregados e não autoclavados (branco; $n = 2$; linha contínua). As barras de erro representam o desvio padrão de cada ponto.

Embora seja difícil indicar a duração da libertação, devido à irregularidade das curvas, esta deverá ser de cerca de 2 h. Os valores obtidos no ensaio do branco (disco não carregado com PHMB) eram da mesma ordem de grandeza da variabilidade que o zero do espectrofotómetro apresentava, pelo que se pode concluir que os discos não libertaram nada

que absorvesse significativamente a 236 nm e que pudesse afetar a determinação da concentração de PHMB. Apesar da elevada variabilidade das réplicas e da curva relativa aos discos que sofreram autoclavagem se situar abaixo da dos discos que não sofreram autoclavagem, não é claro se os discos que sofreram autoclavagem libertam PHMB em menor quantidade, dada a proximidade das duas curvas e a magnitude das barras de erro. Como a principal diferença entre as condições de carregamento nos dois casos foi a temperatura, sendo mais elevada no caso do carregamento durante a autoclavagem, seria de esperar que ocorresse maior carregamento e libertação neste caso, se a temperatura fosse o factor que predominantemente afectasse o carregamento de PHMB, através do seu efeito no coeficiente de difusão da PHMB. Não tendo isso sucedido, tudo indica que deverá haver outro factor a influenciar o carregamento, podendo ser o efeito da temperatura na capacidade de inchaço dos filmes (não estudado). Face à irregularidade observada na curva, não é possível indicar com exactidão a quantidade de PHMB que foi libertada para a célula receptora no final da libertação, sendo de cerca de $420 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (correspondente a cerca de $39 \mu\text{g}/\text{mL}$). No entanto, a duração de libertação obtida com estes discos foi muito inferior aos 2 dias que se pretendia (a frequência de troca de pensos curativos comerciais com PHMB), ou mesmo a 24 h, admitindo uma troca de penso diária.

Ainda que se pretendesse perceber se a libertação da PHMB era controlada por difusão, através de uma análise das curvas de libertação obtidas, não foi possível fazê-lo. Como este estudo seria feito por ajuste das curvas de libertação obtidas aos modelos de *Korsmeyer-Peppas*, *Higuchi*, ordem zero e primeira ordem,¹⁰⁴ não foi possível fazer este ajuste por só haver 2 pontos antes da quantidade de PHMB libertada atingir 60% da quantidade libertada quando se atingiu o estado de equilíbrio, o limite em que se aplicam os modelos de *Korsmeyer-Peppas* e de *Higuchi*, o que aconteceu logo na primeira meia hora. Não foi possível aumentar o número de pontos na primeira meia hora, pois tal implicaria diminuir o intervalo de tempo entre recolhas na fase inicial de cada ensaio. Isso não é possível, dado as 3 réplicas serem ensaiadas em simultâneo, em 3 células de difusão de Franz (de modo a procurar uma boa reprodutibilidade), sucedendo que, durante a montagem de uma célula, não é possível recolher amostras da célula montada anteriormente.

Tal como já referido, estes ensaios de caracterização da libertação de PHMB foram feitos em condições de *infinite sink*, algo que não ocorre nas feridas, pelo que a concentração de PHMB no exsudato poderá ser superior à concentração máxima que se atingiu nos ensaios de libertação. Adicionalmente, deverá ocorrer saturação do exsudato pelo fármaco, o que diminui a taxa de libertação. Deste modo, para os mesmos discos, espera-se que a libertação de PHMB possua uma duração maior em feridas do que nos ensaios em condições de *infinite sink*.

Assim, para se ter uma ideia mais exacta da utilidade destes sistemas, seria necessário, numa 1.^a fase, fazer os ensaios de libertação *in vitro* em condições que mais se aproximassem das condições *in vivo*, em particular, no que diz respeito ao volume de meio e, em seguida, avaliar a actividade antibacteriana da PHMB libertada.

Tentou-se ainda, estudar a libertação de PHMB a partir dos discos carregados com PHMB por adição da PHMB à formulação que não se dissolveram (formulações WD9.4_10a1 e WD9.5.1_10a1, Tabela 2.5, subsecção 2.7.2). No entanto, não foi possível obter ensaios de libertação válidos, tendo em conta a aplicação a que estes filmes se destinam, pois os discos dissolveram-se antes do final do ensaio. Assim, a reprodutibilidade da preparação de discos carregados com PHMB por adição à formulação necessita ser mais estudada.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho foi feito com o objetivo de desenvolver hidrogéis à base de CS, na forma de filme, por evaporação do solvente, para uma aplicação como pensos curativos. Foram desenvolvidas várias formulações para obtenção de filmes, sendo uma delas utilizada na preparação de sistemas de libertação controlada do antisséptico PHMB. A PHMB foi introduzida nos filmes de três maneiras diferentes: (i) por imersão numa solução de PHMB, (ii) por imersão numa solução de PHMB em simultâneo com esterilização por autoclavagem e (iii) por adição de PHMB à formulação utilizada para preparar os filmes. Com este trabalho também se pretendia perceber se os filmes e a libertação de PHMB também seriam afectados de forma significativa pelas condições de uma esterilização por autoclavagem.

A formulação que se seleccionou consistia numa solução contendo CS dissolvido numa solução de LA, SA, uma carbodiimida e glicerol, permitindo preparar filmes onde o CS se encontrava reticulado covalentemente pelo SA. Estes filmes removiam-se facilmente do molde, eram uniformes, lisos, flexíveis e insolúveis em água destilada e em PBS, o que confirmava que se encontravam reticulados. No entanto, foi necessário desenvolver uma metodologia de lavagem, que necessitou ser longa (2 dias e meio), pois libertavam substâncias solúveis em água que absorviam ao comprimento de onda a que se quantificava a PHMB libertada. Os filmes resultantes desta formulação apresentaram uma capacidade de inchaço elevada (1415%) e uma espessura média de 0,45 mm, quando em PBS a pH 7,4, tendo-se conseguido obter boa reprodutibilidade nas espessuras de filmes inchados. Estes filmes suportaram uma esterilização por autoclavagem quando em presença de PBS, mantendo a sua estabilidade térmica e possuindo uma estabilidade térmica superior quando autoclavados na presença de uma solução de PHMB em PBS. Também mantiveram a sua espessura.

Apesar desta formulação apresentar uma resistência ao manuseamento suficiente para ser ensaiada, seria preferível que fosse superior, pelo que tentou-se alterar a formulação. No entanto, não se conseguiu melhorias com as variantes testadas: quando se utilizou HCl como solvente em vez de LA (de modo a não se perder carbodiimida por reacção com o LA e, assim, procurar obter-se um maior grau de reticulação), os filmes resultantes dissolveram-se em água e, quando se adicionou ALG à formulação, que também participaria na reacção de reticulação, não se conseguiu dissolvê-lo ou mantê-lo em solução.

Os filmes de CS reticulados com SA revelaram-se permeáveis à PHMB, o que significa que, durante o carregamento por imersão, a PHMB deverá ser capaz de penetrar no seu interior. Nas condições do principal carregamento estudado (solução de PHMB a 10 mg/mL de PBS, a

34 °C e a pH 7,4), a membrana apresentou uma permeabilidade à PHMB de 268 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e o coeficiente de difusão da PHMB apresentou um valor de $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Na preparação de um sistema de libertação controlada de PHMB por adição da PHMB à formulação antes da preparação dos filmes, não se conseguiu obter filmes que não se dissolvessem durante o ensaio de libertação. Quando foram carregados por imersão numa solução de PHMB durante 24 h, a 34 °C, a quantidade de PHMB libertada quando se atingiu o estado de equilíbrio aumentou 10× quando a concentração da solução de PHMB usada no carregamento também aumentou e se partiu de discos pré-inchados em vez de discos secos, ainda que, em ambos os casos, se libertasse muito rapidamente (entre 1 e 4 h). Aproveitando-se a resistência à autoclavagem quer destes filmes, quer da PHMB, efectuou-se um carregamento em simultâneo com a autoclavagem. As características da libertação de PHMB não foram grandemente alteradas pela autoclavagem, sendo a libertação também muito rápida (duração de cerca de 2 h) e a quantidade de PHMB libertada quando se atingiu o estado de equilíbrio foi próxima da libertada por filmes não autoclavados. Em todos os ensaios feitos neste trabalho, a duração de libertação foi muito inferior à duração de 2 dias que se pretendia. Além disso, não foi possível comparar a quantidade de PHMB libertada com a MIC90 da PHMB para as principais bactérias encontradas em feridas, por se ter trabalhado em condições de *infinite sink*, o que não acontece em feridas, devido ao reduzido volume de exsudato libertado, pelo que não é possível saber se a quantidade de PHMB libertada é suficiente para uma utilização como penso curativo.

Como propostas para trabalho futuro, no que diz respeito a continuar o estudo do desenvolvimento de formulações que permitam obter filmes com melhor resistência ao manuseamento, por aumento da reticulação, poder-se-ia tentar obter filmes de CS usando como solvente uma solução de HCl menos concentrada do que a que foi usada neste trabalho, de modo a poder dissolver o CS num solvente que não reaja com a carbodiimida, em condições em que não hidrolise nem a carbodiimida, nem as ligações glicosídicas do CS. De modo a que o valor de pH da formulação seja mais próximo do valor mais favorável à activação de grupos carboxílicos pela CMC e subsequente reacção destes com grupos amínicos (pH entre 4 e 6), também se poderia substituir o LA por AA, que possui um pK_a superior. Em relação à formulação com CS e ALG, poder-se-ia tentar dissolver quantidades reduzidas de ALG numa solução de CS, investigar até que ponto seria possível aumentar o pH de uma solução de CS sem que ocorresse precipitação do CS e se o ALG se dissolveria nessa solução, bem como alterar a temperatura a que se faz esta dissolução.

Quanto ao carregamento de PHMB nos filmes, poder-se-ia avaliar o resultado de carregamentos por imersão em diferentes soluções de PHMB, menos concentradas do que a

utilizada, de forma a que a diferença de concentração de PHMB na solução de carregamento antes e depois do carregamento fosse mais notável, sendo assim possível saber-se qual a verdadeira capacidade de carregamento dos filmes. De modo a aumentar a duração da libertação de PHMB, poder-se-ia testar filmes que fossem carregados por imersão numa solução de PHMB com uma concentração superior à utilizada ou utilizar filmes mais reticulados. Poder-se-ia, ainda, desenvolver um estudo mais completo de modo a conseguir obter filmes carregados com PHMB por adição à formulação que não se dissolvessem, o que poderá ser possível se se aumentar o grau de reticulação dos filmes, substituindo o LA por HCl, ou diminuindo a quantidade de PHMB que é adicionada na formulação, de forma a reduzir a competição dos grupos =NH da PHMB com os grupos amínicos do CS pelos grupos carboxílicos do SA ativados pela CMC.

Referências

1. Transparency Market Research, <http://www.transparencymarketresearch.com/wound-dressing-market.html>, consultado em 15/9/2020.
2. Sen, C. K. "*Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates*" - *Advances in Wound Care*, 8(2): 39–48 (2019).
3. Markets and Markets, https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/wound-dressings-market-123903496.html?gclid=Cj0KCQjwp4j6BRCRARIsAGq4yMGlMFRlyBm4KfAj3-dLQJaBzE19KtUX1V1N8TrGHYtadBj8LGUe3VMaAnLuEALw_wcB, consultado em 15/9/2020.
4. Markets and Markets, <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/wound-care-market-371.html>, consultado em 15/9/2020.
5. European Commission, *The 2018 Ageing Report: Economic and Budgetary Projections for the EU Member States (2016-2070)*, Publications Office of the European Union: Luxembourg (2018): p 4.
6. Eurostat, http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics, consultado em 15/9/2020.
7. European Union, https://ec.europa.eu/info/files/health-research-diabetes-factsheet_en, consultado em 15/9/2020.
8. Matica, M. A.; Aachmann, F. L.; Tøndervik, A.; Sletta, H.; Ostafe, V. "*Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action*" *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23): 1–33 (2019).
9. Lazarus, G. S.; Cooper, D. M.; Knighton, D. R.; Margolis, D. J.; Percoraro, R. E.; Rodeheaver, G.; Robson, M. C. "*Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing*" *Wound Repair and Regeneration*, 2(3): 165–170 (1994).
10. Percival, N. "*Classification of Wounds and Their Management*" *Surgery*, 20(5): 114–117 (2002).
11. Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. "*The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms*" *Journal of International Medical Research*, 37(5): 1528–1542 (2009).
12. Boateng, J.; Matthews, K.; Stevens, H.; Eccleston, G. "*Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review*" *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8): 2892–2923 (2008).
13. Guo, S.; DiPietro, L. A. "*Critical Review in Oral Biology & Medicine: Factors Affecting Wound Healing*" *Journal of Dental Research*, 89(3): 219–229 (2010).

14. Cutting, K. F. "*Wound Exudate: Composition and Functions*" *British Journal of Community Nursing*, 8(Suppl. 3): S4–S9 (2003).
15. Gonzalez, A. C. D. O.; Andrade, Z. D. A.; Costa, T. F.; Medrado, A. R. A. P. "*Wound Healing - A Literature Review*" *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5): 614–620 (2016).
16. Moore, Z.; Strapp, H. "*Managing the Problem of Excess Exudate*" *British Journal of Nursing*, 24(15): 13–17 (2015).
17. Dhivya, S.; Padma, V.; Santhina, E. "*Wound Dressings – a Review*" *BioMedicine*, 5(4): 24–28 (2015).
18. Forrest, R. D. "*Development of Wound Therapy from the Dark Ages to the Present*" *Journal of the Royal Society of Medicine*, 75(4): 268–273 (1982).
19. Allen, T.; Cullis, P. "*Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream*" *Science*, 303(5665): 1818–1822 (2004).
20. Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M. "*Polymeric Systems for Controlled Drug Release*" *Chemical Reviews*, 99(11): 3181–3198 (1999).
21. Lu, G. W.; Gao, P. *Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery* in: *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Kulkarni V. S., Eds.; Elsevier Inc.: Abbott Park (2010); pp 59-94.
22. Liechty, W. B.; Kryscio, D. R.; Slaughter, B. V.; Peppas, N. A. "*Polymers for Drug Delivery Systems*" *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1): 149–173 (2010).
23. Tiwari, G.; Tiwari, R.; Bannerjee, S.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Sriwastawa, B. "*Drug Delivery Systems: An Updated Review*" *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1): 2–11 (2012).
24. Hoare, T. R.; Kohane, D. S. "*Hydrogels in Drug Delivery: Progress and Challenges*" *Polymer*, 49(8): 1993–2007 (2008).
25. Bessa, L. J.; Fazii, P.; Di Giulio, M.; Cellini, L. "*Bacterial Isolates from Infected Wounds and Their Antibiotic Susceptibility Pattern: Some Remarks about Wound Infection*" *International Wound Journal*, 12(1): 47–52 (2015).
26. Rita, C.; Nikhil, V.; Surapaneni, S. K. "*Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of a Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) Solution: A Potential Root Canal Irrigant*" *Annual Research and Review in Biology*, 15(2): 1–7 (2017).
27. Galante, R.; Pinto, T. J. A.; Colaço, R.; Serro, A. P. "*Sterilization of Hydrogels for Biomedical Applications: A Review*" *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(6): 2472–2492 (2018).

28. Wiegand, C.; Abel, M.; Ruth, P.; Wilhelms, T.; Schulze, D.; Norgauer, J.; Hipler, U. C. "Effect of the Sterilization Method on the Performance of Collagen Type I on Chronic Wound Parameters in Vitro" *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 90 B(2): 710–719 (2009).
29. Stoppel, W. L.; White, J. C.; Horava, S. D.; Henry, A. C.; Roberts, S. C.; Bhatia, S. R. "Terminal Sterilization of Alginate Hydrogels: Efficacy and Impact on Mechanical Properties" *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 102(4): 877–884 (2014).
30. Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Panos, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, A. "Functional Characterization of Chitin and Chitosan" *Current Chemical Biology*, 3(2): 203–230 (2012).
31. de Alvarenga, E. S. "Characterization and Properties of Chitosan" *Biotechnology of Biopolymers*, 24: 91–108 (2011).
32. Hamed, I.; Özogul, F.; Regenstein, J. M. "Industrial Applications of Crustacean By-Products (Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides): A Review" *Trends in Food Science and Technology*, 48: 40–50 (2016).
33. Younes, I.; Sellimi, S.; Rinaudo, M.; Jellouli, K.; Nasri, M. "Influence of Acetylation Degree and Molecular Weight of Homogeneous Chitosans on Antibacterial and Antifungal Activities" *International Journal of Food Microbiology*, 185: 57–63 (2014).
34. Rufato, K. B.; Galdino, J. P.; Ody, K. S.; Pereira, A. G. B.; Corradini, E.; Martins, A. F.; Paulino A. T.; Fajardo, A. R.; Aouada, F. A.; Porta, F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Hydrogels Based on Chitosan and Chitosan Derivatives for Biomedical Applications* in: *Hydrogels Smart Materials for Biomedical Applications*, Popa, L.; Ghica, M. V.; Dinu-Pirvu, C., Eds.; IntechOpen: London (2019); pp 1-40.
35. Valderruten, N. E.; Valverde, J. D.; Zuluaga, F.; Ruiz-Durántez, E. "Synthesis and Characterization of Chitosan Hydrogels Cross-Linked with Dicarboxylic Acids" *Reactive and Functional Polymers*, 84: 21–28 (2014).
36. Ahmadi, F.; Oveisi, Z.; Samani, M.; Amoozgar, Z. "Chitosan Based Hydrogels: Characteristics and Pharmaceutical Applications" *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(1): 1–16 (2015).
37. Rinaudo, M. "Chitin and Chitosan: Properties and Applications" *Progress in Polymer Science*, 31(7): 603–632 (2006).
38. Burrs, S. L.; Vanegas, D. C.; Bhargava, M.; Mechulan, N.; Hendershot, P.; Yamaguchi, H.; Gomes, C.; McLamore, E. S. "A Comparative Study of Graphene-Hydrogel Hybrid Bionanocomposites for Biosensing" *Analyst*, 140(5): 1466–1476 (2015).

39. Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. "*Biomedical Applications of Chitin and Chitosan Based Nanomaterials - A Short Review*" *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 227–232 (2010).
40. Feng, Y.; Borrelli, M.; Reichl, S.; Schrader, S.; Geerling, G. "*Review of Alternative Carrier Materials for Ocular Surface Reconstruction*" *Current Eye Research*, 39(6): 541–552 (2014).
41. Harish Prashanth, K. V.; Tharanathan, R. N. "*Crosslinked Chitosan - Preparation and Characterization*" *Carbohydrate Research*, 341(1): 169–173 (2006).
42. Govindaraj, P.; Abathodharanan, N.; Ravishankar, K.; Raghavachari, D. "*Facile Preparation of Biocompatible Macroporous Chitosan Hydrogel by Hydrothermal Reaction of a Mixture of Chitosan-Succinic Acid-Urea*" *Materials Science and Engineering C*, 104: 1–12 (2019).
43. Tsao, C. T.; Chang, C. H.; Li, Y. D.; Wu, M. F.; Lin, C. P.; Han, J. L.; Chen, S. H.; Hsieh, K. H. "*Development of Chitosan/ Dicarboxylic Acid Hydrogels as Wound Dressing Materials*" *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(5): 519–536 (2011).
44. Meares, C. F. *Bioconjugate Chemistry*, Elsevier Inc.: Rockford (2003); pp 93-98.
45. Cammarata, C. R.; Hughes, M. E.; Ofner, C. M. "*Carbodiimide Induced Cross-Linking, Ligand Addition, and Degradation in Gelatin*" *Molecular Pharmaceutics*, 12(3): 783–793 (2015).
46. Castelló, M. E.; Anbinder, P. S.; Amalvy, J. I.; Peruzzo, P. J. "*Production and Characterization of Chitosan and Glycerol-Chitosan Films*" *MRS Advances*, 3(61): 3601–3610 (2018).
47. Sebti, I.; Martial-Gross, A.; Carnet-Pantiez, A.; Grelier, S.; Coma, V. "*Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against Aspergillus Niger Contamination*" *Food Microbiology and Safety*, 70(2): 100–104 (2005).
48. Dathathri, E.; Thakur, G.; Koteswara, K. B.; Anil Kumar, N. V.; Rodrigues, F. C. "*Investigating the Effect of Freezing Temperature and Cross-Linking on Modulating Drug Release from Chitosan Scaffolds*" *Chemical Papers*, 74(6): 1759–1768 (2020).
49. Becerra, J.; Sudre, G.; Royaud, I.; Montserret, R.; Verrier, B.; Rochas, C.; Delair, T.; David, L. "*Tuning the Hydrophilic/Hydrophobic Balance to Control the Structure of Chitosan Films and Their Protein Release Behavior*" *AAPS PharmSciTech*, 18(4): 1070–1083 (2017).
50. Ma, X.; Qiao, C.; Wang, X.; Yao, J.; Xu, J. "*Structural Characterization and Properties of Polyols Plasticized Chitosan Films*" *International Journal of Biological*

- Macromolecules, 135: 240–245 (2019).
51. Rivero, S.; Damonte, L.; García, M. A.; Pinotti, A. "An Insight into the Role of Glycerol in Chitosan Films" *Food Biophysics*, 11(2): 117–127 (2016).
 52. Bhattarai, N.; Edmondson, D.; Veisoh, O.; Matsen, F. A.; Zhang, M. "Electrospun Chitosan-Based Nanofibers and Their Cellular Compatibility" *Biomaterials*, 26(31): 6176–6184 (2005).
 53. Jiang, H.; Fang, D.; Hsiao, B. "Preparation and Characterization of Ibuprofen-Loaded Poly(Lactide-Co-Glycolide)/Poly(Ethylene Glycol)-g-Chitosan Electrospun Membranes" - *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(3): 37–41 (2012).
 54. Tang, C.; Guan, Y. X.; Yao, S. J.; Zhu, Z. Q. "Preparation of Ibuprofen-Loaded Chitosan Films for Oral Mucosal Drug Delivery Using Supercritical Solution Impregnation" *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1–2): 434–441 (2014).
 55. J. Varshosaz; Karimzadeh, S. "Development of Cross-Linked Chitosan Films for Oral Mucosal Delivery of Lidocaine" *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2: 43–52 (2007).
 56. Chen, H.; Li, B.; Feng, B.; Wang, H.; Yuan, H.; Xu, Z. "Tetracycline Hydrochloride Loaded Citric Acid Functionalized Chitosan Hydrogel for Wound Healing" *Royal Society of Chemistry Advances*, 9(34): 19523–19530 (2019).
 57. Popa, L.; Ghica, M. V.; Dinu-Pîrvu, C. "Periodontal Chitosan-Gels Designed for Improved Local Intra-Pocket Drug Delivery" *Farmacia*, 61(2): 240–250 (2013).
 58. Chen, G.; Ali, F.; Dong, S.; Yin, Z.; Li, S.; Chen, Y. "Preparation, Characterization and Functional Evaluation of Chitosan-Based Films with Zein Coatings Produced by Cold Plasma" *Carbohydrate Polymers*, 202(29): 39–46 (2018).
 59. de Paula, G. F.; Netto, G. I.; Mattoso, L. H. C. "Physical and Chemical Characterization of Poly(Hexamethylene Biguanide) Hydrochloride" *Polymers*, 3(2): 928–941 (2011).
 60. Küsters, M.; Beyer, S.; Kutscher, S.; Schlesinger, H.; Gerhartz, M. "Rapid, Simple and Stability-Indicating Determination of Polyhexamethylene Biguanide in Liquid and Gel-like Dosage Forms by Liquid Chromatography with Diode-Array Detection" *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(6): 408–414 (2013).
 61. Mulder, G. D.; Cavorsi, J. P.; Lee, D. K. "Feature: Polyhexamethylene Biguanide (PHMB): An Addendum to Current Topical Antimicrobials" *Wounds*, 19(7): 173–182 (2007).
 62. Butcher, M. "PHMB: An Effective Antimicrobial in Wound Bioburden Management" *British Journal of Nursing*, 21(12): 16–21 (2012).
 63. Kaehn, K. "Polihexanide: A Safe and Highly Effective Biocide" *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(Suppl. 1): 7–16 (2010).

64. Chindera, K.; Mahato, M.; Kumar Sharma, A.; Horsley, H.; Kloc-Muniak, K.; Kamaruzzaman, N. F.; Kumar, S.; McFarlane, A.; Stach, J.; Bentin, T.; Good, L. "*The Antimicrobial Polymer PHMB Enters Cells and Selectively Condenses Bacterial Chromosomes*" *Scientific Reports*, 6(February): 1–13 (2016).
65. The Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) of the European Commission. *Opinion on the Safety of Poly(Hexamethylene) Biguanide Hydrochloride (PHMB) – SCCS/1535/14 (2nd rev.)*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, (2015).
66. Fabry, W.; Kock, H. J. "*In-Vitro Activity of Polyhexanide Alone and in Combination with Antibiotics against Staphylococcus Aureus*" *Journal of Hospital Infection*, 86(1): 68–72 (2014).
67. Cowley, N. L.; Forbes, S.; Amézquita, A.; McClure, P.; Humphreys, G. J.; McBain, A. J. "*Effects of Formulation on Microbicide Potency and Mitigation of the Development of Bacterial Insusceptibility*" *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20): 7330–7338 (2015).
68. Fabry, W. H. K.; Kock, H. J.; Vahlensieck, W. "*Activity of the Antiseptic Polyhexanide against Gram-Negative Bacteria*" *Microbial Drug Resistance*, 20(2): 138–143 (2014).
69. Dealey, C.; Cameron, J.; Arrowsmith, M. "*A Study Comparing Two Objective Methods of Quantifying the Production of Wound Exudate*" *Journal of Wound Care*, 15(4): 149–153 (2006).
70. European Chemicals Agency (ECHA). *Opinion Proposing Harmonised Classification and Labelling at Community Level of Polyhexamethylene Biguanide or Poly(Hexamethylene) Biguanide Hydrochloride or PHMB – ECHA/1272/2008*, ECHA: Helsinki (2011).
71. Ng, I. S.; Ooi, C. W.; Liu, B. L.; Peng, C. T.; Chiu, C. Y.; Chang, Y. K. "*Antibacterial Efficacy of Chitosan- and Poly(Hexamethylene Biguanide)-Immobilized Nanofiber Membrane*" *International Journal of Biological Macromolecules*, 154: 844–854 (2020).
72. Dilamian, M.; Montazer, M.; Masoumi, J. "*Antimicrobial Electrospun Membranes of Chitosan/Poly(Ethylene Oxide) Incorporating Poly(Hexamethylene Biguanide) Hydrochloride*" *Carbohydrate Polymers*, 94(1): 364–371 (2013).
73. Eberlein T, K. J. "*Use of a Cellulose PHMB Dressing in Clinical Practice.*" *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 10(3): 1–6 (2014).
74. Saadatkhah, N.; Carillo Garcia, A.; Ackermann, S.; Leclerc, P.; Latifi, M.; Samih, S.; Patience, G. S.; Chaouki, J. "*Experimental Methods in Chemical Engineering: Thermogravimetric Analysis—TGA*" *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1):

- 34–43 (2020).
75. Nam, Y. S.; Park, W. H.; Ihm, D.; Hudson, S. M. "Effect of the Degree of Deacetylation on the Thermal Decomposition of Chitin and Chitosan Nanofibers" *Carbohydrate Polymers*, 80(1): 291–295 (2010).
 76. Leceta, I.; Guerrero, P.; Ibarburu, I.; Dueñas, M. T.; De La Caba, K. "Characterization and Antimicrobial Analysis of Chitosan-Based Films" *Journal of Food Engineering*, 116(4): 889–899 (2013).
 77. Cardenas, G.; Miranda, A. P. "FTIR and TGA Studies of Chitosan Composite Films" *Journal of Chilean Chemical Society*, 49(4): 291–295 (2004).
 78. Jurairat Nunthanid, Satit Puttipipatkachorn, Keiji Yamamoto, G. E. P. "Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films" *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(2): 143–157 (2001).
 79. Alonso, J. G.; Peniche-Covas, C.; Nieto, J. M. "Determination of the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by Thermal Analysis" *Journal of Thermal Analysis*, 28(1): 189–193 (1983).
 80. Zawadzki, J.; Kaczmarek, H. "Thermal Treatment of Chitosan in Various Conditions" *Carbohydrate Polymers*, 80(2): 394–400 (2010).
 81. Ray, M.; Pal, K.; Anis, A.; Banthia, A. K. "Development and Characterization of Chitosan-Based Polymeric Hydrogel Membranes" *Designed Monomers and Polymers*, 13(3): 193–206 (2010).
 82. Kittur, F. S.; Harish Prashanth, K. V.; Udaya Sankar, K.; Tharanathan, R. N. "Characterization of Chitin, Chitosan and Their Carboxymethyl Derivatives by Differential Scanning Calorimetry" *Carbohydrate Polymers*, 49(2): 185–193 (2002).
 83. Lauto, A.; Hook, J.; Doran, M.; Camacho, F.; Poole-Warren, L. A.; Avolio, A.; Foster, L. J. R. "Chitosan Adhesive for Laser Tissue Repair: In Vitro Characterization" *Lasers in Surgery and Medicine*, 36(3): 193–201 (2005).
 84. Kusmono; Abdurrahim, I. "Water Sorption, Antimicrobial Activity, and Thermal and Mechanical Properties of Chitosan/Clay/Glycerol Nanocomposite Films" *Heliyon*, 5(8): e02342 (2019).
 85. Debandi, M.; Bernal, C.; Francois, N. J. "Development of Biodegradable Films Based on Chitosan/Glycerol Blends Suitable for Biomedical Applications" *Journal of Tissue Science & Engineering*, 7(3): 1–9 (2016).
 86. Sousa, I.; Maia, F.; Silva, A.; Cunha, Â.; Almeida, A.; Evtyugin, D. V.; Tedim, J.; Ferreira, M. G. "A Novel Approach for Immobilization of Polyhexamethylene Biguanide within Silica Capsules" *Royal Society of Chemistry Advances*, 5(112): 92656–92663

(2015).

87. Sinko, P. J. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 6th ed., Wolters Kluwer: Baltimore (2011).
88. Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed., Clarendon Press: Oxford (1967).
89. Amidon, G. L.; Lee, P. I.; Topp, E. M. *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc: New York (2000).
90. Schneider, L. A.; Korber, A.; Grabbe, S.; Dissemond, J. "Influence of PH on Wound-Healing: A New Perspective for Wound-Therapy?" *Archives of Dermatological Research*, 298(9): 413–420 (2007).
91. Luo, Y.; Kirker, K. R.; Prestwich, G. D. "Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Films *New Biomaterials*" *Journal of Controlled Release*, 69: 169–184 (2000).
92. Fierheller, M.; Sibbald, R. G. "A Clinical Investigation into the Relationship between Increased Periwound Skin Temperature and Local Wound Infection in Patients with Chronic Leg Ulcers" *Advances in Skin & Wound Care*, 23(8): 369–379 (2010).
93. European Pharmacopoeia Commission, *Dissolution Test for Solid Dosage Forms - Ph. Eur. 6.0, 20903 (01/2008)*, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM): Strasbourg (2008).
94. Wu, T.; Zivanovic, S.; Hayes, D. G.; Weiss, J. "Efficient Reduction of Chitosan Molecular Weight by High-Intensity Ultrasound: Underlying Mechanism and Effect of Process Parameters" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13): 5112–5119 (2008).
95. Friedman, M. "Food Browning and Its Prevention: An Overview" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3): (1996).
96. Kroh, L. W. "Caramelisation in Food and Beverages" *Food Chemistry*, 51(4): 373–379 (1994).
97. Kasaai, M. R.; Arul, J.; Charlet, G. "Fragmentation of Chitosan by Acids" *The Scientific World Journal*, 2013: 1–11 (2013).
98. Gilles, M. A.; Hudson, A. Q.; Borders, C. L. "Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution" *Analytical Biochemistry*, 184(2): 244–248 (1990).
99. Spinks, G. M.; Lee, C. K.; Wallace, G. G.; Kim, S. I.; Kim, S. J. "Swelling Behavior of Chitosan Hydrogels in Ionic Liquid-Water Binary Systems" *Langmuir*, 22(22): 9375–9379 (2006).
100. Meng, X.; Tian, F.; Yang, J.; He, C. N.; Xing, N.; Li, F. "Chitosan and Alginate Polyelectrolyte Complex Membranes and Their Properties for Wound Dressing

- Application*" Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21(5): 1751–1759 (2010).
101. Gutsche, S.; Krause, M.; Kranz, H. "*Strategies to Overcome PH-Dependent Solubility of Weakly Basic Drugs by Using Different Types of Alginates*" Drug Development and Industrial Pharmacy, 34(12): 1277–1284 (2008).
 102. Byun, Y.; Singh, V. K.; Yang, V. C. "*Low Molecular Weight Protamine: A Potential Nontoxic Heparin Antagonist*" Thrombosis Research, 94(1): 53–61 (1999).
 103. Yuan, Y.; Wang, L.; Amemiya, S. "*Chronoamperometry at Micropipet Electrodes for Determination of Diffusion Coefficients and Transferred Charges at Liquid/Liquid Interfaces*" Analytical Chemistry, 76(18): 5570–5578 (2004).
 104. Dash, S.; Murthy, P. N.; Nath, L.; Chowdhury, P. "*Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems*" Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 67(3): 217–223 (2010).
 105. Ravindranathan, S.; Koppolu, B. P.; Smith, S. G.; Zaharoff, D. A. "*Effect of Chitosan Properties on Immunoreactivity*" Marine Drugs, 14(5): 1–12 (2016).
 106. Schwarz, S.; Silley, P.; Simjee, S.; Woodford, N.; van duijkeren, E.; Johnson, A. P.; Gastra, W. "*Editorial: Assessing the Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Obtained from Animals*" Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(4): 601–604 (2010).

Anexos

Anexo I

Curva de calibração de PHMB

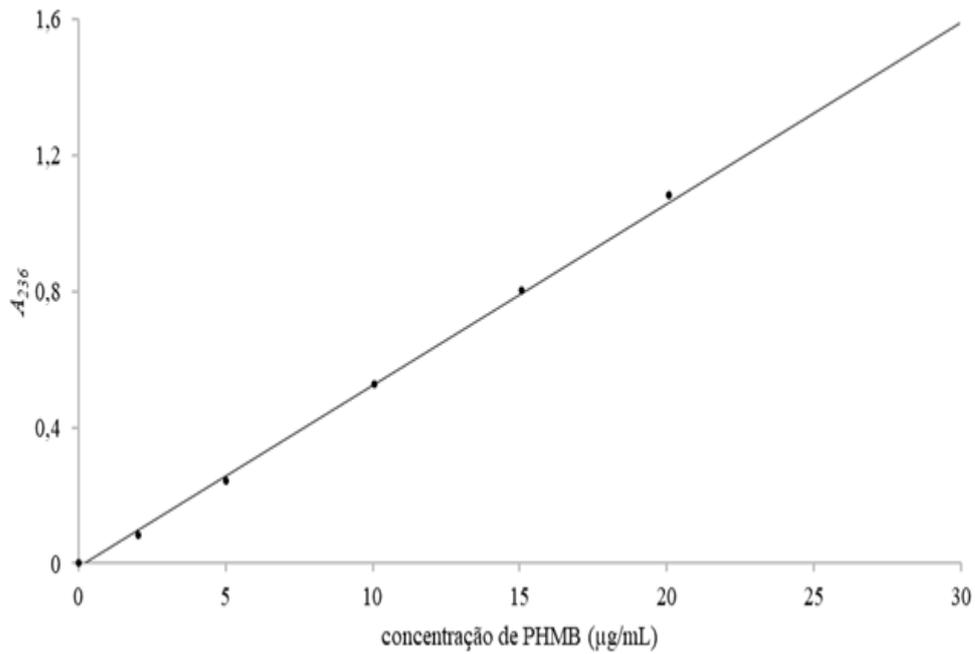


Figura AI.1 – Curva de calibração de PHMB, que relaciona a absorvância a 236 nm com a concentração de PHMB na gama 2-30 $\mu\text{g/mL}$ de PBS ($n = 3$; barras de erro: desvio padrão – não visíveis, dado a sua reduzida magnitude).

Anexo II

Transições presentes em termogramas de TGA e DTG de quitosano encontrados na literatura

Tabela AII.1 – Intervalo de temperatura da primeira (T_1) e da segunda (T_2 , a principal) transições, temperatura da taxa máxima de perda de massa da transição principal (T_2^{\max}) e percentagem de perda de massa total, obtidas em estudos por TGA de CS na forma de pó e na forma de filme.

PM ($\times 10^3$ g/mol)	DD (%)	T_1 (°C)	T_2 (°C)	T_2^{\max} (°C)	Perda de massa da transição principal (%)	Perda de massa total (%)	Referência
Pó							
10	99,2	-*	-*	280	43	-*	79
10	97	-*	-*	280	46	-*	79
400	87	-*	-*	-*	40	-*	81
-*	89	100-193	256-333	303	-*	-*	82
-*	> 65	90	200-300	-*	44	66	35
Filme							
150	70-78	100-168	230-400	274	43	64	80
-*	83	< 120	-*	287	-*	63	85
-*	83	< 120	-*	300	-*	85	85
-*	>75	< 100	-*	290	21	-*	76
160	90	< 120	190-350***	-*	-*	-*	50
263	92	-*	-*	295	36	-*	77
50-60	100	35-160	280-350	-*	-*	-*	78
800-1000	100	35-160	280-350	-*	-*	-*	78
400	87	-*	-*	-*	40	-*	81
-*	> 85	-*	-*	317	-*	63	83
-*	> 65	50-200	200-400	-*	-*	-*	35

*- Informação não indicada.

** - CS fornecido pela ACROS, assumindo-se um DD de 98%¹⁰⁵.

*** - Transição indicada inclui evaporação de GLY que ocorre entre 180°C e os 225°C^{76,85}.