



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

CINARA VASCONCELOS DA SILVA

IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE AGENTES
BIOATIVOS EM CURATIVOS POLIMÉRICOS
USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO



SALVADOR
2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL**

CINARA VASCONCELOS DA SILVA

**IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS EM CURATIVOS
POLIMÉRICOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

**SALVADOR
2018**

CINARA VASCONCELOS DA SILVA

**IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS EM CURATIVOS
POLIMÉRICOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Industrial.

Orientadores:

Prof^a Dr^a Elaine C. de M. Cabral Albuquerque

Prof. Dr. Silvio Alexandre Beisl Vieira de Melo

Dr^a Ana Maria Antunes Dias (Universidade de Coimbra, Portugal)

SALVADOR
2018

Vasconcelos da Silva, Cinara
IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS EM
CURATIVOS POLIMÉRICOS USANDO CO2 SUPERCRÍTICO / Cinara
Vasconcelos da Silva. -- Salvador, 2018.
136 f. : il

Orientadora: Elaine Christine de Magalhães Cabral
Albuquerque.

Coorientador: Silvio Alexandre Beisl Vieira de
Melo.

Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em
Engenharia Industrial) -- Universidade Federal da
Bahia, Escola Politécnica, 2018.

1. curativos poliméricos. 2. sorção de CO2. 3.
impregnação/deposição de agentes bioativos. 4. CO2
supercrítico. I. de Magalhães Cabral Albuquerque,
Elaine Christine. II. Beisl Vieira de Melo, Silvio
Alexandre . III. Título.

**“IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE AGENTES BIOATIVOS EM CURATIVOS
POLIMÉRICOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO”.**

CINARA VASCONCELOS DA SILVA

Tese submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Profa. Dra. Karen Valverde Pontes Karen Pontes
Doutor em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2008.

Prof. Dr. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa F. L. P.
Doutor em Engenharia Química, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1992.

Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo E. S. V.
Doutor em Química, pela Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 1995.

Prof. Dr. Sílvio do Desterro Cunha S. D. C.
Doutor em Química, pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1999.

Profa. Dra. Gloria Meyberg Nunes Costa G. M. N. C.
Doutor em Engenharia Industrial, pela Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2009.

Salvador, BA - BRASIL
fevereiro/2018

Ao meu marido e minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais Diana e Ademar, pelo amor, incentivo e compreensão e à minha família pelo apoio de sempre.

À Fábio, Mi e Maya, por me apoiarem, me iluminarem e me fazerem feliz.

Aos “fofinhos”, em particular, André e Islane, pelo grande apoio, estímulo, imensa amizade e porque a ciência não evolui sem conversas, risadas e um pouco de vinho.

Ao pessoal do GSP (*Green Sustainable Processes Lab*): António, Elisa, Luízinha, Márcia e em particular, às fofas: Luísa, Rita e Sofia, por todo o suporte técnico no laboratório, almoços, cafés, risadas, amizade e carinho.

Somados ao pessoal do GSP, aos amigos que fiz em Coimbra por fazerem me sentir em casa. Uma vez Coimbra, para sempre saudades!

Ao amigo Diego, por me incentivar a não desistir, pelas discussões e dias de estudo, entre aprendizados, risadas e taças de vinho.

À Fernanda, Mariluce, Ana Cláudia (Pé), Vânia, Cida e Flávia pela amizade de sempre.

Ao prof. Eudes Velozo, meu eterno orientador, pelas discussões, risadas, estímulos, aprendizagem e amizade em quase vinte anos de convivência nem sempre pacífica.

Aos meus colegas de trabalho e professores da Faculdade de Farmácia pelo incentivo, em particular, para Amanda, Danila, Luciane, Neilson e Nice, pelo apoio, cafés, sugestões, incentivo nos momentos de desespero e a Profa. Edith Cristina pela amizade, apoio e compreensão.

Aos orientadores, Mara e Silvio e, em particular, Elaine e Ana pela motivação, orientação e amizade.

Aos professores Glória e Hermínio pelos ensinamentos, questionamentos e puxões de orelha.

À CAPES pelo suporte financeiro para realização do trabalho (FTC/CAPES 355/13) e pela bolsa concedida no período em que estive em Portugal (CAPES 7984-13-8).

À Tatiane dos Reis Woytysiak pela disponibilidade em ajudar.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Muito obrigada!

The waiting drove me mad,
You're finally here and I'm a mess
I take your entrance back,
Can't let you roam inside my head
I don't want to take what you can give,
I would rather starve than eat your bread
I would rather run but I can't walk,
Guess I'll lie alone, just like before
I'll take the varmint's path and I must refuse your test,
A-push me and I will resist
This behavior's not unique,
I don't want to hear from those who know
They can buy but can't put on my clothes,
I don't want to limp for them to walk
Never would have known of me before,
I don't want to be held in your debt
And I'll pay it off in blood, let I be wed
And I'm already cut up and half dead,
I'll end up alone like I began
Everything has chains absolutely nothing's changed
Take my hand, not my picture, spilled my tincture
I don't want to take what you can give
I would rather starve than eat your bread
All the things that others want for me
Can't buy what I want because its free
Can't be what you want because I'm
I ain't supposed to be just fun
Oh, to live and die, let it be done
I figure I'll be dammed, all alone like I began
It's your move now, I thought you were a friend
but I guess I, I guess I hate you
(Corduroy - Pearl Jam, Vitalogy, 1994)

RESUMO

O presente trabalho visou estudar a viabilidade de incorporação de agentes bioativos em curativos poliméricos utilizando dióxido de carbono supercrítico (CO₂). Foram utilizados dois curativos comerciais: *Foam Dressing* (poliuretano) e *Promogran*[®] (colágeno e celulose regenerada oxidada). Como bioativos, foram testados o óleo de borage e o extrato de jambu. Foram realizados ensaios de sorção de CO₂ supercrítico nessas matrizes poliméricas sob diferentes condições, de modo a potencializar a incorporação de agentes bioativos. Isto pode ser útil para futuros trabalhos na área de impregnação/deposição de agentes bioativos em curativos de espuma, já que é o primeiro estudo com estes tipos de material (curativos e bioativos) nestas condições experimentais. Os resultados mostraram que a melhor condição de sorção para ambos os polímeros foi obtida na temperatura de 308,15 K e densidade do CO₂ igual a 850 kg.m⁻³. O melhor rendimento de impregnação para o óleo de borage em poliuretano (11,8 % m/m) ocorreu nessa mesma densidade do CO₂ e na temperatura de 328,15 K. Para o extrato de jambu, o maior rendimento de incorporação na matriz de colágeno e celulose ocorreu nas condições de melhor sorção e com adição de etanol como cossolvente (6,4% m/m). Os resultados obtidos mostraram que a etapa controladora do processo de impregnação/deposição (SSI/SSD) é o equilíbrio de fases e apontam para a possível viabilidade técnica da impregnação de bioativos de origem natural em curativos poliméricos.

Palavras-chave: curativos poliméricos; sorção; impregnação/deposição; CO₂ supercrítico; óleo de borage; extrato de jambu

ABSTRACT

The present work aimed to study the feasibility of incorporation of bioactive agents into polymeric dressings using supercritical carbon dioxide (CO₂). Two commercial dressings were investigated: Foam Dressing (polyurethane) and Promogran® (collagen and oxidized regenerated cellulose). The bioactives investigated were borage oil and jambu extract. Assays of supercritical CO₂ sorption into these polymeric dressings were carried out under different conditions in order to enhance the incorporation of these bioactive agents into the polymer matrices. This can be useful for future works on impregnation/deposition area of bioactive agents in foam dressings, since the study is the first one using these materials (dressings and bioactives) at these experimental conditions. The results showed that the best sorption condition for both polymers was obtained at 308 K and CO₂ density equal to 850 kg.m⁻³. The best impregnation/deposition yield for borage oil and polyurethane (11.8 % w/w) occurred also at this same CO₂ density and temperature at 328,15 K. In the case of jambu extract, the highest incorporation yield into the collagen and cellulose matrix occurred under the conditions of highest sorption with the addition of ethanol as a cosolvent (6,4 % w/w). The results showed that SSI/SSD is controlled by phase equilibrium phenomenon and point towards the technical feasibility of this process.

Keywords: Polymeric Dressings; scCO₂ sorption; scCO₂ impregnation/deposition; supercritical fluid technology; borage oil; jambu extract

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Representação histológica da pele; (B) Representação da estrutura da epiderme	24
Figura 2 – Esquema do processo de cicatrização	26
Figura 3 – Estrutura de um monômero do poliuretano	32
Figura 4 – Esquema de liberação de APIs em curativo moderno	32
Figura 5 – Borage (<i>Borago officinallis</i>)	35
Figura 6 – Estrutura dos principais ácidos graxos encontrados no óleo de borage	36
Figura 7 – Jambu (<i>Spilanthes acmella</i> var. <i>oleraceae</i>)	37
Figura 8 – Estrutura do espilantol	38
Figura 9 – Incorporação de API por fusão do polímero	40
Figura 10 – Incorporação de API por modificação da matriz polimérica	40
Figura 11 – Incorporação de API por dissolução em solventes	41
Figura 12 – Impregnação de API por via úmida	42
Figura 13 – Diagramas de fase do CO ₂ : A) Pressão × Temperatura e B) Densidade × Pressão	44
Figura 14 – Mecanismos de impregnação/deposição usando scCO ₂ : A) deposição física (SSD) e B) dispersão ou impregnação com deposição (SSI/SSD)	48
Figura 15 – Esquemas de sistemas descontínuo e contínuo de SSI/SSD: (a) Esquema genérico de um sistema de SSI/SSD descontínuo: 1) reservatório de CO ₂ , 2) bomba de CO ₂ de alta pressão, 3) válvula anti-retorno, (4,5,6,11 e 12) válvulas, 7) banho de água termostaticado, 8) célula de impregnação, 9) termômetro, 10) transdutor de pressão e 13) trap; (b) Esquema genérico de um sistema de SSI/SSD contínuo: 1 e 3) Indicador de fluxo de CO ₂ , 2 e 4) Indicador de temperatura, 5) indicador de pressão, P1 e P2 são bombas, E1: vaso de saturação, E2: vaso de impregnação, T: trap	50
Figura 16 - Esquema das etapas de impregnação/deposição: a) início da pressurização, b) solubilização do API em scCO ₂ , c) tempo de contato, d) despressurização. Os diagramas P x T representam: I) etapa em que CO ₂ torna-se um fluido supercrítico; II) etapa de sorção do CO ₂ no polímero e III) etapa de impregnação e despressurização.	51
Figura 17 – Interações entre bioativo, scCO ₂ e matriz polimérica em SSI/SSD	57
Figura 18 – Curva esquemática para pressão ou massa X tempo de duração dos experimentos de sorção/dessorção em polímeros. Em (1) Carregamento da célula de alta pressão com a amostra; (2) Pressurização com CO ₂ ; (3) Absorção de CO ₂ pelo polímero; (4) Despressurização rápida; (5) Transferência da amostra para a balança; (6) Registro da massa durante a dessorção.	61
Figura 19 – Diagrama genérico de um aparato para experimentos de sorção de CO ₂ : 1) cilindro de CO ₂ ; 2) bomba de alta pressão; 3) Válvula de retenção 4)	61

Indicador de pressão; 5) Banho com temperatura constante; 6) Célula de alta pressão; 7) Indicador de temperatura; 8) Válvula para despressurização

Figura 20 – Curativo de poliuretano comercial utilizado nos experimentos 71

Figura 21 – Curativo de colágeno/celulose (Promogran®) utilizado nos experimentos 71

Figura 22 – Esquema do sistema de sorção. Onde: 1) Reservatório de CO₂, 2) Bomba de CO₂ de alta pressão, 3) Banho de ar com temperatura controlada 4) célula de sorção de abertura rápida, 5) Controlador e indicador de temperatura, 6) transdutor de pressão, 7) Foto da célula. 72

Figura 23 – Foto do suporte e do esquema da célula de alta pressão utilizados no sistema de impregnação/deposição 74

Figura 24 – Esquema do equipamento de SSI/SSD. 1) Reservatório de CO₂, 2) Bomba de CO₂ de alta pressão, 3) banho de água termostaticado, 4) célula de impregnação inox de alta pressão, 5) agitador magnético, 6) transdutor de pressão, 7) “trap” de vidro, 8) controlador/indicador de temperatura. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos e composição dos principais curativos modernos	28
Tabela 2 – Agentes bioativos de origem natural promissores para utilização em feridas	34
Tabela 3 – Propriedades físicas de alguns fluidos	45
Tabela 4 – Exemplos de trabalhos publicados sobre a impregnação/deposição de polímeros utilizando scCO ₂ e bioativos de origem natural para aplicações biomédicas nos últimos 20 anos	67
Tabela 5 – Condições experimentais para os ensaios de sorção/ dessorção	73
Tabela 6 – Condições experimentais para os ensaios de impregnação/ deposição	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Letras Latinas

C	Concentração		
D	Coeficiente de difusão		
F	Fluxo de massa		
P	Pressão		
P _c	Pressão crítica		
t	Tempo		
T	Temperatura		
T _c	Temperatura crítica		
T _g	<i>Glass transition temperature</i>	-	Temperatura de transição vítrea
T _m	<i>Melting temperature</i>	-	Temperatura de fusão cristalina
V	Volume		

Letras Gregas

ρ – Massa específica ou densidade absoluta

Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária		
API	<i>Active Pharmaceuticals Ingredients</i>	-	Ingredientes Farmacêuticos Ativos
DSC	<i>Differential Scanning Calorimeter</i>	-	Calorimetria Exploratória Diferencial
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>	-	Matriz extracelular
FSC	Fluido supercrítico		
FTIR-ATR	<i>Fourier Transformed Infrared - Attenuated Total Reflectance</i>	-	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada
GLA	<i>Gamma linolenic acid</i>	-	Ácido γ -linolênico

GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>	-	Geralmente Reconhecido como Seguro
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	-	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
ORC	<i>Oxidized Regenerated Celulose</i>	-	Celulose Regenerada Oxidada
PGLA	<i>Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Acid</i>	-	Poliácido láctico-co-ácido glicólico
PLA	<i>Poly(D,L-Lactide) Acid</i>	-	Poliácido Láctico
PU	Poliuretano		
scCO ₂	<i>Supercritical Carbon Dioxide</i>	-	Dióxido de Carbono Supercrítico
SSI/SSD	<i>Supercritical Solvent Impregnation/ Supercritical Solvent Deposition</i>	-	Impregnação com Solvente Supercrítico/Deposição com Solvente Supercrítico
RMN	Ressonância magnética nuclear		
UV/Vis	Ultravioleta/visível		
WVP	<i>Water Vapor Permeability</i>	-	Permeabilidade de vapor d'água
WVTR	<i>Water Vapor Transmission Rate</i>	-	Taxa de transmissão de vapor d'água

SUMÁRIO

Capítulo I – Introdução	15
1.1 Introdução	16
1.2 Objetivos	19
1.2.1 Objetivo Geral	19
1.2.2 Objetivos Específicos	19
1.3 Estrutura do Trabalho	20
Capítulo II – Revisão de Literatura	21
2. Introdução	22
2.1 A Pele	22
2.1.1 Composição química e estrutura da pele	22
2.2 Feridas e o processo de cicatrização	23
2.3 Curativos	25
2.3.1 Classificação dos curativos	27
2.3.1.1 Curativos a base de polímeros naturais	28
2.3.1.2 Curativos a base de polímeros sintéticos	30
2.3.1.3 Curativos medicados	32
2.4 Incorporação de bioativos em matrizes poliméricas	38
2.4.1 Incorporação de bioativos em matrizes poliméricas por técnicas tradicionais	39
2.4.2 Incorporação de bioativos utilizando CO ₂ supercrítico	42
2.4.3 Impregnação/deposição por solvente supercrítico (SSI/SSD)	46
2.4.3.1 Fundamentos de transporte de massas associados a polímeros	51
2.4.3.2 Interações no processo de impregnação/deposição supercrítica entre polímero-bioativo e scCO ₂	56
2.4.3.2.1 Interação polímero - scCO ₂	57
2.4.3.2.2 Interação API - scCO ₂	62
2.4.3.3 Interação API-polímero	64

2.4.4 Conclusões	66
Capítulo III – Materiais e Métodos	69
3.1 Materiais	70
3.2 Métodos	70
3.2.1 Ensaios de sorção/dessorção	70
3.2.2 Impregnação/Deposição	73
3.2.3 Quantificação do óleo de borage e extrato de Jambu impregnados nos curativos	77
3.2.4 Caracterização dos curativos impregnados e não impregnados	78
Capítulo IV – Resultados e Discussão	81
4.1 Resultados e Discussão	82
Effect of scCO ₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO ₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing	83
Supercritical solvent impregnation/deposition of spilanthol-enriched extracts into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing	94
Capítulo V – Conclusões e Sugestões	107
5.1 Conclusões	108
5.2 Sugestões	110
Referências Bibliográficas	112
Apêndices	126
A1. Lista de Publicações	127
A2. Glossário de termos técnicos (área médico-farmacêutica)	128
Anexos	133
Autorizações de uso dos artigos publicados na tese	134

Capítulo I

Introdução

1.1 Introdução

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, correspondendo cerca de 16% do peso corporal (BLANES, 2004). Apresenta natureza multifuncional, complexa, estrutura resistente, flexível e bastante impermeável (ANDREU et al., 2015). A pele protege o organismo contra agentes físicos (proteção contra agressões mecânicas medidas pela deformação reversível de sua estrutura), químicos e patogênicos (BOROJEVIC; SERRICELLA, 1999).

Ao sofrer qualquer tipo de injúria ou ferimento, a pele promove uma cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual. Esta reconstituição tecidual ou cicatrização consiste em um processo dinâmico, contínuo, complexo e interdependente, composto por uma série de fases sobrepostas, que depende de vários fatores como: localização anatômica, idade, mobilidade, tipo de pele, raça, técnica cirúrgica utilizada, estado nutricional e imunológico, doenças associadas (como diabetes) e uso de medicamentos (BLANES, 2004; FARSAEI et al., 2012; MANDELBAUM et al., 2003).

Muitos artifícios são utilizados para a aceleração do processo de cicatrização ou regeneração de tecidos e a escolha adequada do método depende de aspectos econômicos, sociais e condições clínicas do paciente (idade, estado nutricional, imobilidade e vascularização). O uso de curativos poliméricos modernos é uma das abordagens mais utilizadas e constitui um importante segmento do mercado médico-farmacêutico mundial (BOATENG et al., 2008).

Curativos são usados como auxiliares na regeneração e reparação de tecidos durante o processo de cicatrização e sua classificação baseia-se nos materiais que os constituem. Vários polímeros são empregados para a produção de curativos, entre os quais, destacam-se ácido hialurônico, alginato, gelatina, colágeno, celulose, quitosana, pectina e poliuretano. Curativos constituídos destes biomateriais auxiliam na renovação do tecido conjuntivo, atuam na proteção (evitam proliferação microbiana e trauma) e absorção de umidade da lesão, além de facilitar a permeação de vapor de água (BOATENG et al., 2008).

Substâncias bioativas ou APIs (*Active Pharmaceutical Ingredients* - Insumos Farmacêuticos Ativos), que aceleram a cicatrização, tais como antibióticos, vitaminas, fatores de crescimento, podem ser associados aos curativos poliméricos para melhorar a biocompatibilidade e evitar processos inflamatórios e/ou rejeição (DIAS et al., 2013; MOURA et al., 2013).

A incorporação de bioativos aos curativos poliméricos pode ser realizada através de diferentes processos. As técnicas tradicionais geralmente envolvem o uso de solventes orgânicos, altas temperaturas, consumo de energia e múltiplas etapas. Embora apresentem baixo custo, não incorporam seletivamente os bioativos quando os APIs estão em mistura, extrato ou óleo e podem deformar significativamente a estrutura polimérica dos curativos (CHUNG et al. 2013; SHEN et al., 2016; SUBRAHMANYAM et al., 2016). Além disso, esses tipos de processamento apresentam alguns desafios, como heterogeneidade na incorporação dos APIs, dificuldade na remoção do solvente orgânico da matriz polimérica e aumento de escala (DUARTE et al., 2013; IVANOVIC et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017).

O uso do CO₂ supercrítico (scCO₂ – *Supercritical* CO₂) no processo de incorporação de substâncias terapêuticas em biomateriais tem se revelado uma alternativa viável aos processos tradicionais, pois utiliza condições brandas de temperatura e oferece a possibilidade de esterilização da matriz polimérica. Além disso, o processo com CO₂ supercrítico pode ser livre de solventes orgânicos, reprodutível e escalonável (KNEZ et al., 2014; PERRUT e CLAVIER, 2003).

Tal processo permite preparar materiais com diferentes quantidades de substâncias bioativas e/ou extratos impregnados, bem como a obtenção de diferentes taxas de liberação, através de manipulação de condições operacionais (BRAGA et al., 2008; DIAS et al., 2011; YAÑEZ et al., 2011). No entanto, apesar de possuir inúmeras vantagens, o uso do scCO₂ também apresenta limitações, devido a sua incapacidade de solubilizar moléculas de alta massa molar e/ou de natureza polar (BIERHALZ et al., 2014; BUSH et al., 2007; CHAMPEAU et al., 2015a; NATU et al., 2008).

O rendimento final do processo de impregnação/deposição supercrítica, no entanto, depende das interações específicas existentes entre todos os materiais envolvidos (polímero, bioativo e CO₂ supercrítico), a exemplo da solubilidade do API e

polímero no CO₂ supercrítico, o coeficiente de partição do bioativo nas fases polimérica e fluida e a resistência difusional no interior da matriz polimérica (AROSO et al., 2015; BOULEDJOUIDJA, 2016).

Nesse contexto, o agente bioativo a ser impregnado precisa apresentar determinada solubilidade no fluido supercrítico (no entanto, esta solubilidade não deve ser muito elevada, pois o API pode ser removido junto com o CO₂ na etapa de despressurização). Por outro lado, a matriz polimérica deve apresentar baixa ou nenhuma solubilidade no gás denso, mas deve ter a capacidade de intumescer na presença do scCO₂ para facilitar a penetração da mistura (scCO₂ + API no polímero (BRAGA et al., 2015; MUSTAPA et al., 2016).

Desta maneira, a mistura penetra na matriz polimérica, dilatando-a e facilitando a dispersão do API e sua deposição após a despressurização. Ao final do processo, a matriz retorna às dimensões originais ou próximas as suas dimensões iniciais (MUSTAPA et al., 2016).

Este trabalho foi desenvolvido como parte de um projeto FTC/CAPES de cooperação internacional entre Brasil (UFBA/UFPA) e Portugal (Universidade de Coimbra), intitulado “Tecnologias supercríticas para o desenvolvimento de aplicações farmacêuticas e cosméticas à base de polímeros naturais e de extratos vegetais bioativos” e, propõe a utilização de CO₂ supercrítico para a impregnação/deposição de APIs naturais em curativos poliméricos comerciais sintéticos e naturais. A escolha das matrizes poliméricas está relacionada com o aumento do potencial de mercado dos curativos utilizados, bem como pelas características dos materiais, a exemplo da homogeneidade, quando comparadas aos materiais obtidos em laboratório. Os agentes bioativos, óleo de borage e extrato de jambu, foram escolhidos por serem utilizados na medicina popular, apresentarem baixa toxicidade e potencialidade para aplicações na indústria farmacêutica.

Em termos de produto, a espuma de poliuretano (PU) é utilizada para ferimentos abertos, com exsudação moderada e não infectados, já que absorve o exsudato e tem a vantagem de requerer trocas de curativos com menor frequência, uma vez que o curativo não é biodegradável. Associado ao óleo de borage, o curativo pode permitir a remoção e limpeza mais fácil do tecido morto da ferida e, devido às propriedades terapêuticas do óleo, acelerar a cicatrização e prevenir infecções. Óleos ricos em ácidos

graxos essenciais, como o óleo de borage, são frequentemente utilizados para o tipo de ferimento a que o curativo de poliuretano se propõe e, também são usados, associados à gaze (curativos simples, de baixo custo, passíveis de contaminação, com alta aderência, que podem causar dor e inflamação ao ser removido).

Curativos de celulose e colágeno são utilizados para ferimentos com exsudato moderado, crônicos a exemplo de escaras e pé diabético, cirúrgicos ou queimaduras até o 2º grau (queimaduras mais graves que podem deixar cicatriz). São contraindicados para ferimentos infeccionados e muito graves. Tem como grande vantagem serem biodegradáveis e acelerarem a cicatrização e como maior desvantagem o custo. Quando associado ao extrato de jambu (obtido em etapa anterior do projeto FTC/CAPES), além de acelerar a cicatrização e prevenir infecções, o curativo pode apresentar efeito anestésico e analgésico, com possibilidade de melhorar a qualidade do processo de cicatrização e promover mais conforto para o paciente.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar a viabilidade técnica de impregnação/deposição de óleo de borage e do extrato de jambu em curativos poliméricos comerciais usando CO₂ supercrítico.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade de sorção de CO₂ supercrítico em dois tipos de curativos poliméricos comerciais, um sintético (poliuretano) e um natural (colágeno e celulose);
- Investigar os efeitos de pressão, temperatura e densidade do CO₂ na impregnação/deposição de APIs nas matrizes poliméricas escolhidas em termos de rendimento;
- Caracterizar as matrizes poliméricas, antes e após a sorção e impregnação/deposição, quanto à morfologia, porosidade, eficiência e seletividade da impregnação/deposição supercrítica.

1.3 Estrutura do Trabalho

O presente trabalho é constituído por 5 capítulos. O primeiro capítulo é composto por esta introdução e os objetivos do trabalho.

O Capítulo 2 consiste de uma revisão bibliográfica referente ao tema. Inicialmente, é feita uma breve descrição sobre a pele e o processo de cicatrização, tipos de curativos e de alguns agentes bioativos naturais com possibilidade de associação com curativos. A seguir, os métodos de incorporação de agentes bioativos são rapidamente explicados. Alguns detalhes sobre fluido supercrítico e principais premissas do processo de deposição/impregnação supercrítica utilizando CO₂ supercrítico e as interações entre os componentes envolvidos neste processo, são abordados mais profundamente ao final do capítulo.

O Capítulo 3 trata dos materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho experimental.

O Capítulo 4 trata dos resultados e da discussão em formato de dois artigos publicados no periódico *Journal of Supercritical Fluids* e alguns resultados que não constam nestes artigos. O primeiro artigo intitulado “*Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing*” aborda a interação entre o CO₂ supercrítico e o poliuretano, discutindo o processo de impregnação/deposição neste tipo de curativo. O segundo artigo denominado “*Supercritical solvent impregnation/deposition of spilanthol-enriched extracts into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing*” apresenta os resultados obtidos no processo de sorção de CO₂ no curativo, bem como na impregnação/deposição supercrítica do extrato de Jambu obtido por extração supercrítica em uma etapa anterior a este estudo por outros membros da equipe.

O Capítulo 5 apresenta as considerações finais, conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

As referências bibliográficas, os apêndices e o anexo são apresentados ao final da tese.

Capítulo II

Revisão de Literatura

2. Introdução

São apresentados neste capítulo, conceitos básicos relacionados à tese. Em decorrência do caráter multidisciplinar do documento, alguns assuntos foram brevemente abordados, para melhor entendimento e desenvolvimento do trabalho, a exemplo da estrutura da pele e o processo de reparação desta ao sofrer uma lesão, além dos materiais utilizados na parte experimental do trabalho.

A seguir, é apresentada uma revisão de literatura sobre o processo de impregnação/deposição supercrítica e fatores e fenômenos relacionados a este, já que tem despertado o interesse de pesquisadores e da indústria, por apresentar algumas vantagens e soluções para problemas encontrados com a utilização de técnicas convencionais.

2.1 A Pele

2.1.1 Composição química e estrutura da pele

O tecido cutâneo é composto por cerca de 70% de água; 27,5% de substâncias de origem proteica como aminoácidos e proteínas (elastina, colágeno, melanina, queratina, querato-hialina, enzimas e hormônios) e outros componentes nitrogenados (ácidos nucleicos, glicoproteínas e ácido hialurônico). Os outros 2,5% são compostos de lipídeos, glicosídeos e sais minerais (CUNHA et al., 2011).

A pele é composta principalmente de duas camadas distintas: a epiderme, camada mais superficial e a derme, que está intimamente ligada a uma camada mais interna formada por tecido adiposo e tecido conjuntivo frouxo, denominada de hipoderme ou camada subcutânea (Figura 1A) (METCALFE; FERGUSON, 2007).

A epiderme possui uma estrutura constituída de diferentes camadas, formadas principalmente por queratinócitos (células epiteliais), que sofrem diferenciação à medida que se aproximam da superfície da pele (Figura 1B) (RIBEIRO, 2010). Dentre as camadas da epiderme, a camada basal e a camada granulosa merecem destaque. As principais funções da camada basal são suportar mecanicamente a epiderme, estabelecer contato com a derme e atuar como barreira e filtro seletivo (CUNHA et al., 2011; RIBEIRO, 2010). A camada granulosa previne a desidratação das camadas da pele,

forma barreira e oferece resistência à absorção percutânea (CUNHA et al., 2011; RIBEIRO, 2010). Calcula-se que a epiderme humana se renove integralmente a cada 20 a 30 dias.

A derme é a camada mais profunda, altamente vascularizada, formada por tecido conjuntivo – fibras colágenas e elásticas, glicosaminoglicanos e fibroblastos capazes de produzir enzimas reparadoras como proteases e colagenases, que possuem papel importante no processo de cicatrização (BLANES, 2004; RIBEIRO, 2010).

O dano ou perda da integridade da pele causados por feridas podem prejudicar as suas funções em variadas extensões, que vão desde incapacidade até a morte (ZHONG et al., 2010). Os tipos de feridas e o processo de cicatrização serão vistos mais detalhadamente nas seções seguintes.

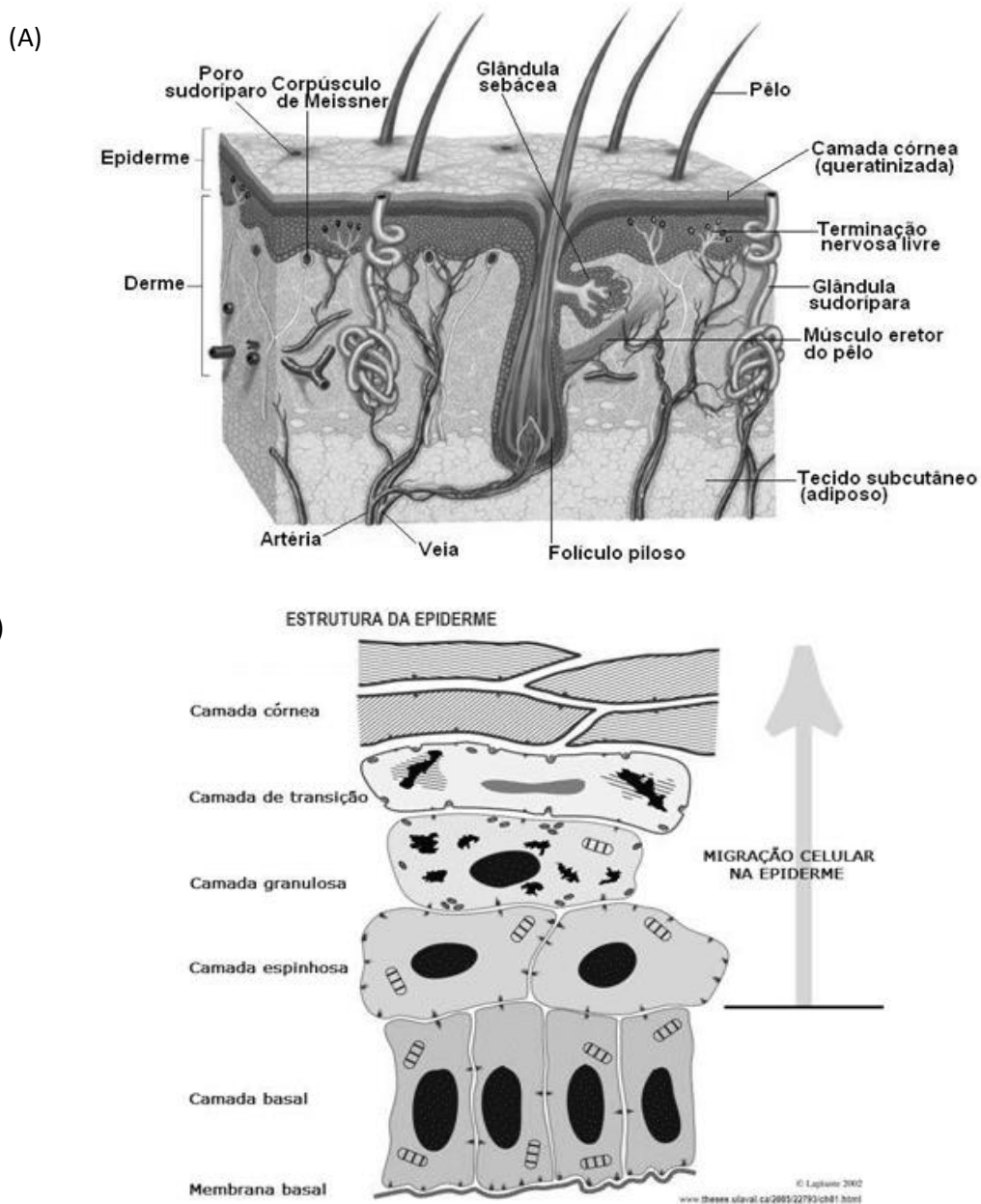
2.2 Feridas e o processo de cicatrização

“Feridas ou ferimentos” podem ser definidos como o resultado da ruptura anatômica e funcional da pele. Em geral, são consequências de uma agressão causada por qualquer trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que interrompe a continuidade de um tecido corpóreo e aciona o sistema imunológico para a proteção contra infecções causadas por microrganismos (BLANES, 2004; BOATENG; CATANZANO, 2015; EHRENREICH; RUSZCZAK, 2006).

A depender da intensidade do trauma, a ferida pode ser considerada superficial ou profunda e baseando-se na natureza do processo de reparação tecidual ou cicatrização, pode ser classificada em crônica ou aguda (BOATENG et al., 2008).

As feridas agudas são geralmente lesões que se curam completamente com cicatrizes mínimas entre 8-12 semanas e cujas causas podem ser traumas mecânicos, procedimentos cirúrgicos e queimaduras. Feridas crônicas, por outro lado, são lesões teciduais que cicatrizam lentamente (acima de 12 semanas) ou são recorrentes, devido às condições fisiológicas dos pacientes como idade avançada, diabetes ou injúrias repetitivas (BOATENG et al., 2008; SINGER e DAGUM, 2008, ZHONG et al., 2010).

Figura 1 – (A) Representação histológica da pele; (B) Representação da estrutura da epiderme



FONTE: Retirado de Bioloja Materiais Didáticos (<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>); Projeto Feridas UEL (<http://projetoferidas.zip.net/images/epiderm1.jpg>)

A reparação cutânea ou cicatrização consiste em um processo dinâmico, contínuo, complexo e interdependente, composto pelos seguintes eventos sobrepostos: 1) hemostasia, 2) inflamação, 3) diferenciação de células, proliferação e migração celular para o local da ferida, 4) renovação celular e 5) remodelamento da pele para a formação de cicatriz (GUO e DIPIETRO, 2010; HANNA e GIACOPELLI, 1997). Estes eventos podem

ser agrupados em três etapas: inflamação, proliferação e remodelamento, descritas a seguir (Figura 2).

A fase de inflamação tem duração de aproximadamente 4 dias e possui como objetivo ativar o sistema de coagulação e defesa da lesão contra bactérias (WILD et al., 2010). Nesta fase, há liberação de um exsudato.

A fase de proliferação tem por objetivo a criação da barreira de permeabilidade (renovação celular), estabelecimento do fornecimento adequado de sangue e reforço do tecido lesionado (LI et al., 2007).

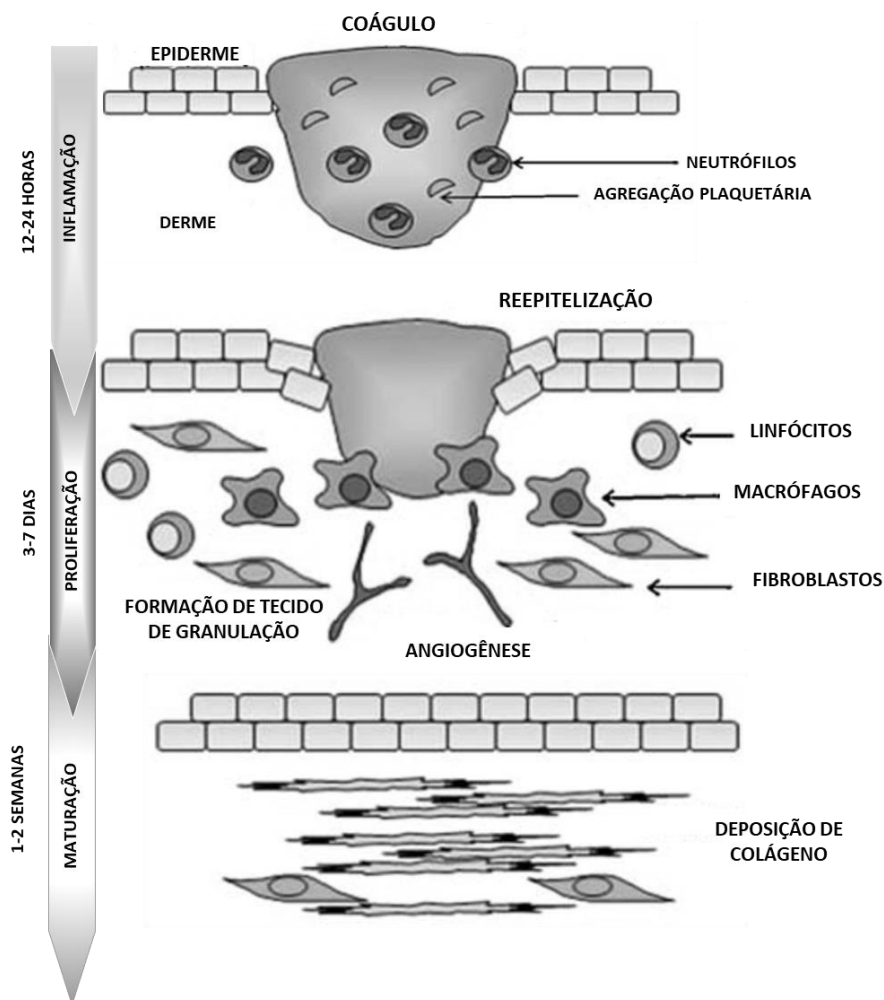
A fase de remodelação é caracterizada pela remodelagem do colágeno em uma estrutura mais organizada e forte. No entanto, o tecido reparado não recupera as propriedades da pele não lesada e normal (GUO; DIPIETRO, 2010; GURTNER et al.; 2008, SINGER; CLARK, 1999; WILD et al., 2010).

Algumas estratégias podem ser adotadas para auxiliar ou acelerar o processo de reparação cutânea, a exemplo do uso de curativos.

2.3 Curativos

Historicamente, considerava-se que os curativos possuíam apenas um papel passivo no processo de cicatrização, servindo como barreira física contra contaminantes e sendo permeável para umidade e oxigênio (BOATENG; CATANZANO, 2015; MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014). No entanto, estudos recentes provaram que curativos úmidos podem acelerar a cicatrização, pois através de um ambiente úmido, evita-se a desidratação que pode levar à necrose do tecido. A presença do curativo pode acelerar a formação da cicatriz (FRANCO; GONÇALVES, 2007; MOURA et al., 2013).

Figura 2 – Esquema do processo de cicatrização



FONTE: Retirado de KONDO; ISHIDA (2010)

Os curativos devem apresentar algumas características desejáveis como promover o debridamento (limpeza), prover ou manter a umidade do local, permitir trocas gasosas, absorver o exsudato, prevenir infecção e prover isolamento térmico. Além disso, precisa ser confortável, atóxico, não-alérgeno e ter facilidade de aplicação e remoção, com frequência mínima de trocas (BOATENG et al., 2008; HANNA; GIACOPELLI, 1997; JONES; GREY; HARDING, 2006; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A escolha do tipo de curativo a ser utilizado deve levar em conta a natureza, a localização e o tamanho da ferida, as condições do paciente, bem como a relação custo-benefício para o paciente ou unidade de saúde. Apesar de haver uma grande variedade

de curativos, um só não preenche os requisitos necessários para ser aplicado em todos os tipos de ferida (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

2.3.1 Classificação dos curativos

Os curativos podem ser classificados, conforme sua função - primários (contato direto com a ferida), secundários (cobrem os curativos primários) e insulares (possuem a parte central absorvente e são cobertos com uma porção adesiva). Podem, ainda, ser classificados pelo tipo de material, forma física e como curativos tradicionais ou modernos (BOATENG et al., 2008).

Os curativos tradicionais foram e ainda são utilizados no manejo de feridas. Estes incluem curativos secos (gaze e bandagens) e formulações farmacêuticas tópicas (soluções, suspensões, emulsões, cremes e pomadas com substâncias antimicrobianas e cicatrizantes a exemplo da prata, iodo e ácidos graxos essenciais). Devido à sua baixa capacidade de cobertura dos ferimentos, os curativos secos têm sido recomendados para feridas abertas e secas ou como curativos secundários. As formulações farmacêuticas tópicas têm como desvantagem o pouco tempo que permanecem no leito da ferida, principalmente quando há excesso de exsudato, pois absorvem o fluido, perdem suas características reológicas e tornam-se móveis (BOATENG et al., 2008; BOATENG; CATANZANO, 2015; FRANCO; GONÇALVES, 2008; KIM et al., 2011; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Os curativos modernos têm como principal característica manter a umidade no leito da ferida para facilitar a cicatrização e podem ser classificados pela forma física (filme, espuma ou gel) e pelos tipos de material a serem produzidos (BOATENG et al., 2008). Além desta classificação, estes dispositivos ainda podem ser classificados como inertes ou ativos (quando associados a um API) (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

Os curativos modernos são constituídos, basicamente de polímeros naturais ou sintéticos biocompatíveis, com propriedades distintas.

A Tabela 1 apresenta os diferentes tipos de curativos a base de polímeros, bem como a forma de apresentação do curativo polimérico.

Tabela 1 – Tipos e composição dos principais curativos modernos

Tipo	Descrição	Vantagens	Limitações	Exemplos
Geis - Hidrocoloides	Proteínas - colágeno, gelatina; Polissacarídeos – celulose e derivados, pectina	Formam gel em contato com exsudato, mantendo meio úmido, favorecem a limpeza, semipermeáveis para água e oxigênio. Indicados para feridas secas, com pouco ou médio exsudato e com dano parcial do tecido	Contraindicados para feridas com dano total, queimaduras de terceiro grau e feridas fúngicas ou infectadas, podem causar odor desagradável	Duoderm®, Tegasorb®
Geis – Hidrogeis	Polímeros formadores de geis (polimetilacrilat o e polivinilpirrolidi na). Podem ser associados à alginatos.	Uso em feridas superficiais com pouco exsudato (com alginato – médio), úlceras e queimaduras de 1º e 2º graus. Favorecem regeneração, meio úmido e limpeza	Não devem ser usados em feridas cirúrgicas fechadas, com muito exsudato, pele íntegra e infeccionada. Requerem curativo secundário e troca frequente	Dermagran®, Duoderm gel®, Hydrosorb®, Hydrosorb Plus®, Hypligel®, Nu-Gel®, Elasto-gel®
Geis - Alginatos	Alginato de Cálcio e Sódio	Uso em feridas exsudativas ou com sangramento, feridas agudas ou crônicas, infectadas. Absorvem o exsudato e mantém o meio úmido, limpeza, permeável a água e oxigênio	Requerem cobertura secundária e troca frequente, não devem ser usados em feridas secas ou com pouco exsudato	Acquacell®, Curasorb®, Kaltostat®
Espumas	Polímeros absorventes e porosos (poliuretano)	Uso em feridas exsudativas. Absorvem exsudato, mantêm meio úmido, isolamento térmico, permeável a água e oxigênio e requerem trocas menos frequentes	Não devem ser usados em feridas secas ou com pouco exsudato	Lyfoam®, Allevyn®
Filmes	Polímeros transparentes adesivos	Uso em feridas secas, com dano parcial, proteção de área, cobertura secundária. Mantêm umidade, semipermeáveis à vapor d'água e oxigênio, adaptáveis.	Não deve ser usado em feridas com exsudato ou infectadas	Tegaderm®, Opsite®, Bioclusive®, Hydrofilm®

FONTE: BOATENG et al., 2008; FRANCO; GONÇALVES, 2008; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; MOURA et al., 2013

2.3.1.1 Curativos a base de polímeros naturais

Os polímeros naturais são mais comumente utilizados na medicina regenerativa devido a características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e similaridade com a matriz extracelular (ECM - *Extra Cellular Matrix*) (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014). São obtidos por fontes microbianas, animais ou vegetais e apesar de suas vantagens, eles apresentam limitações, tais como heterogeneidade, variação de lote,

baixa estabilidade e pobre desempenho mecânico. Os polímeros naturais mais utilizados na produção de curativos são a base de polissacarídeos como derivados da celulose e proteínas como colágeno e gelatina (DUARTE et al., 2013; MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014; MOURA et al., 2013).

A celulose e seus derivados são interessantes como curativos, pois são biocompatíveis, no entanto, naturalmente, não são biodegradáveis porque as células humanas não produzem enzimas para a metabolização e quebra dessas moléculas (MOURA et al., 2013).

Alguns derivados da celulose, a exemplo de metilcelulose, hidroxipropilcelulose, carboximetilcelulose são solúveis em água quente ou fria a depender da concentração. Ésteres de celulose podem formar fibras e filmes (MOURA et al., 2013). Fibras de celulose podem ser regeneradas com o objetivo de organizar as fibras quando tratadas com tetróxido de dinitrogênio, que oxida os grupos hidroxilas em ácidos carboxílicos produzindo o ácido poliglicurônico, o principal componente da celulose regenerada oxidada (ORC). Neste material, algumas hidroxilas permanecem não oxidadas nas fibras e o resultado disso é um curativo hemostático e bactericida (LEWIS et al., 2013).

A biocompatibilidade da celulose pode ser melhorada com a combinação com outros polímeros como o colágeno, além de poder ser impregnada com agentes antimicrobianos, antiinflamatórios e anestésicos (MOURA et al., 2013). Alguns curativos comerciais contendo celulose são: *Promogran*[®], *Promogran Prisma*[®], *Dermacol/Ag*TM, *Aquacel Hydrofiber Wound Dressing*[®], *Membracel*[®], *ADAPTIC*[®] *Malha Não Aderente e Nexfill*[®].

O colágeno é a proteína mais abundante da ECM presente nos tecidos humanos. É produzido pelos fibroblastos e estimula a cicatrização, desenvolvimento de novos tecidos e a limpeza da ferida. Na matriz dérmica, os principais tipos de colágeno são o I e o III. Estes colágenos apresentam uma forma fibrilar ou de haste e são compostos por três cadeias de proteína de tripla hélice dispostas de uma forma linear. Esta orientação linear proporciona grande parte da resistência à tração da pele. Suas propriedades mecânicas, de degradação e absorção de água podem ser melhoradas por reticulação química (*cross-linking*) usando glutaraldeído, carboimida, genipina e diisocianato de hexametileno; ou por ligações com outros polímeros e proteínas (BOATENG;

CATANZANO, 2015; FITZGERALD; STEINBERG, 2009; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; MOURA et al., 2013).

Para a cicatrização de feridas ocorrer, é necessário um equilíbrio entre as atividades de degradação proteica pelas proteases e a síntese e deposição de proteínas do tecido de granulação. Os curativos com colágeno têm por objetivo reduzir os níveis excessivos de protease e restabelecer o ambiente da ferida. Além disso, esses produtos servem para estimular o processo de cicatrização (BOATENG; CATANZANO, 2015; FITZGERALD; STEINBERG, 2009; MOURA et al., 2013). São exemplos de curativos comerciais com colágeno: *Fibracol Plus*[®], *Promogran*[®], *Promogran Prisma*[®], *Puracol Plus*[®], *Hy Cure*[®].

Gelatina é outro polímero natural usado na produção de curativos. É derivada do colágeno, que sofreu processo de desnaturação parcial ácida ou alcalina (MOURA et al., 2013; MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014). São exemplos de curativos comerciais com gelatina: *Spongostan*[®], *DuoDERM*[®] CGF, *Gelfoam*[®] e *Casex Curactive*[®].

2.3.1.2 Curativos a base de polímeros sintéticos

Vários polímeros sintéticos são atualmente utilizados na produção de curativos. Muitos deles apresentam como característica a capacidade de absorver umidade para evitar o excesso de exsudato. Geralmente, possuem maior força mecânica que os polímeros naturais, o que permite uma troca de curativos com menor frequência. Podem ser produzidos por várias técnicas e usados em combinação com agentes bioativos para acelerar a cicatrização (BOATENG; CATANZANO, 2015; MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014; MOURA et al., 2013).

Os polímeros sintéticos comumente empregados em curativos incluem álcool polivinílico (PVA), óxido de polietileno (PEO), polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), poliésteres (poliácido láctico – PLA, ácido poliglicólico (PGA), poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) e policaprolactona (PCL)) e poliuretano (PU). Dentre eles, destaca-se o poliuretano, pois apresenta propriedades mecânicas excelentes, estabilidade térmica e química, boa compatibilidade e alta versatilidade (BERWIG, 2006; HEATH; COOPER, 2013; MOURA et al., 2013).

Poliuretanos (PU) são polímeros sintéticos, amplamente usados em dispositivos médicos como catéteres, marca-passos, válvulas cardíacas, próteses vasculares,

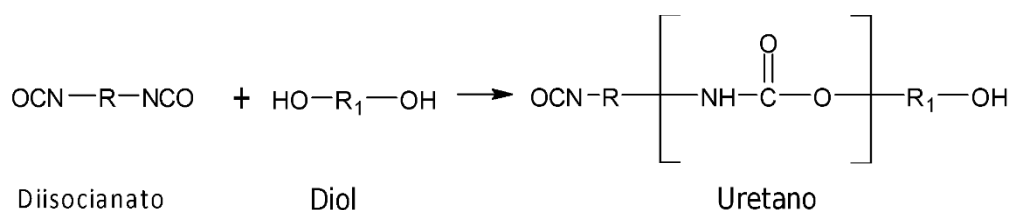
recobrimento de “*stents*” esofágicos e curativos (BERWIG, 2006; HEATH; COOPER, 2013; MOURA et al., 2013).

São sintetizados por condensação de diisocianatos e poliois. Devido à grande variedade de monômeros utilizados em sua produção, apresentam propriedades físico-químicas e biológicas diferentes, além de poderem ser facilmente reticulados. Apresentam boa versatilidade, pois quando misturados com outros polímeros, podem ser processados na forma de partículas, fibras, filmes, hidrogeis e espumas (BERWIG, 2006; MOURA et al., 2013).

Um poliuretano (PU) elastomérico utilizado para curativos apresenta um bloco de copolímeros alternados com dois tipos segmentos: um segmento cristalino (vítreo ou rígido) e um outro segmento flexível e elástico. O segmento flexível é um polioliol com um grupo éter ou éster na cadeia principal enquanto o segmento rígido é um carbamato ou uretano, resultado da reação entre um diisocianato e um diol de cadeia curta, que influencia propriedades mecânicas como elasticidade, dureza e resistência a tensão. Ligações de hidrogênio ocorrem entre os segmentos rígido e flexível, o que leva à separação de fases, ou seja, a composição do polímero não será homogênea. Através de modificações nas quantidades e na estrutura destes dois segmentos, diferentes tipos de PU podem ser obtidos para diferentes propósitos (BRISCOE; KELLY, 1996; ITO et al., 2007; TEO et al., 1996; ZHANG et al., 2014). Na figura 3, é apresentado um exemplo da estrutura do uretano, segmento rígido do poliuretano.

Para o uso em curativos ou “*scaffolds*”, poliuretanos biodegradáveis e não tóxicos têm sido requeridos e por isso, poliois suscetíveis à degradação têm sido estudados, a exemplo do polilactídeo, poliglicolídeo e a policaprolactona, enquanto para os segmentos rígidos são evitados diisocianatos aromáticos, por resultarem em produtos de degradação carcinogênicos (HEATH; COOPER, 2013).

Espumas e filmes de poliuretano são as principais formas utilizadas para curativos porque permeiam oxigênio e vapor d’água, além de prover o isolamento térmico da ferida (MOURA et al., 2013).

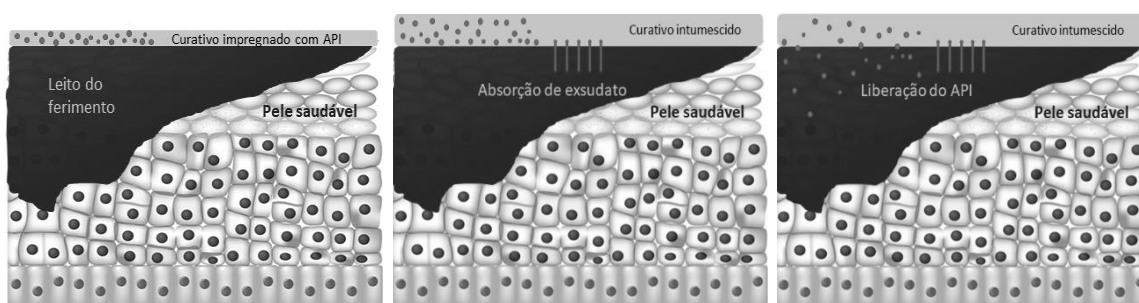
Figura 3 – Estrutura de um monômero do poliuretano

FONTE: A autora (2018)

2.3.1.3 Curativos medicados

Os curativos modernos são concebidos para terem atividade biológica por sua composição química ou por conterem agentes terapêuticos, com o objetivo de acelerar o processo de cicatrização. Os APIs incorporados podem desempenhar papéis diretos no processo de cicatrização de feridas, como limpeza ou, indiretos como fármacos antimicrobianos, anti-inflamatórios, cicatrizantes, analgésicos, anestésicos ou fatores de crescimento (auxiliares na regeneração dos tecidos) (BOATENG; CANTAZANO, 2015).

A liberação de fármaco a partir de matrizes poliméricas é controlada por um ou mais processos físicos incluindo: (1) hidratação do polímero por fluidos, (2) inchaço para formar um gel, (3) difusão do API através da matriz polimérica, e (4) eventual degradação / erosão do sistema polimérico (Figura 4) (BOATENG; CANTAZANO, 2015).

Figura 4 – Esquema de liberação de APIs em curativo moderno

FONTE: A autora (2018) (Adaptado de BOATENG; CANTAZANO, 2015)

Alguns curativos comercializados apresentam APIs sintéticos como sulfadiazina de prata (Allevyn[®], Meliplex Ag[®]), incorporados aos curativos para acelerar a sua cicatrização. Além destes, vários agentes bioativos de origem animal e vegetal têm sido estudados e utilizados como pomadas ou cremes cicatrizantes (como própolis, arnica,

calêndula e camomila) ou mesmo como curativo polimérico medicado, a exemplo do mel (Medihoney® e Surgihoney®) (BOATENG; CATAZANO, 2015; MOURA et al., 2013).

Estes agentes bioativos naturais podem ser encontrados na forma de produtos naturais isolados ou como extratos. A tendência é de se utilizar um produto natural isolado (único ativo), pela vantagem da reprodutibilidade do efeito terapêutico, maior eficácia, segurança, qualidade e maior facilidade de estabelecer o controle de qualidade para uma única substância. Entretanto, o uso de extratos (mistura complexa de substâncias) também se justifica pela dificuldade de isolamento ou determinação de das substâncias responsáveis pelo efeito terapêutico ou porque este efeito é promovido pela interação entre as substâncias presentes no extrato ou ainda, pela influência de algum (s) composto (s) na absorção ou solubilidade das substâncias ativas (SCHENKEL et al., 2007).

De acordo com a ANVISA (2001), os curativos medicados são considerados produtos de classe de risco III (alto risco) e dependem de evidências científicas válidas de que o dispositivo é seguro e eficaz sob suas condições de uso, obtidas através dos testes pré-clínicos e dos testes clínicos.

São apresentados algumas plantas e agentes bioativos naturais que apresentaram resultados promissores para o tratamento de feridas e aceleração do processo de cicatrização na Tabela 2.

Dentre os bioativos citados, merecem destaque o borage (óleo) e o jambu (extrato de flores), devido às suas atividades biológicas promissoras para o tratamento de feridas.

- Óleo de borage

Borage (*Borago officinalis*) é uma planta pertencente à família Boraginaceae, originária da região oeste do Mediterrâneo, que cresce em quase toda a Europa e América do Norte (figura 5). Apresenta em sua composição, substâncias voláteis (β -cariofileno, *p*-cimeno-8-ol), mono, sesquiterpenos e ácidos graxos poliinsaturados como o ácido γ -linolênico (GLA - *Gamma Linolenic Acid*) (10–28%), ácido linoleico (ALA – *Linoleic Acid*) (35–40%), ácido α -linolênico (4–5%) (AAL) e o ácido oleico (PIESZAK et al., 2012).

Tabela 2 – Agentes bioativos de origem natural promissores para utilização em feridas

Agente Bioativo	Propriedades	Referências
Mel	Antimicrobiano, debridante, anti-inflamatório, Polifenóis, açúcares, ácidos orgânicos	BOATENG; CANTAZANO, 2015; MOLAN; BETTS, 2004
Própolis	Antimicrobiano, antioxidante, imunomodulatório Flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, ácidos benzoicos	BOATENG; CANTAZANO, 2015
Aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i>)	Antimicrobiano e antisséptico Polissacarídeos, glicoproteínas, lupeol, ácido salicílico, fenois	BOATENG; CANTAZANO, 2015 SILVA et al., 2013a SILVA et al., 2013b
Camomila (<i>Chamomila recutita</i> , <i>Matricaria chamomila</i>)	Antimicrobiano, anti-inflamatório, estimula renovação celular Flavonoides, óleos essenciais	MOTEALLEH et al., 2014 SRIVASTAVA et al., 2010
Açafrão da terra (<i>Curcuma longa</i>)	Antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante Grupos fenólicos (curcuminoides)	VAUGHN et al., 2016
Calêndula (<i>Calendula officinalis</i>)	Antimicrobiano, anti-inflamatório, angiogênico e fibroplástico Flavonoides, óleos essenciais, taninos	FRONZA et al., 2009 LAVAGNA et al., 2001 PARENTE et al., 2012
Aroeira (<i>Schinus molle</i>)	Antimicrobiano, anti-inflamatório Flavonoides, óleos essenciais, triterpenos, sesquiterpenoides	SCHMIDT et al., 2009
Jambu (<i>Spilanthes acmella</i> var. <i>oleraceae</i>)	Analgésico, anestésico, anti-inflamatório Triterpenos, ácidos graxos, óleos essenciais e alcamidas	CAVALCANTI, 2008 FREITAS, 2014 YAMANE, 2016
Borage (<i>Borago officinalis</i>)	Anti-inflamatório, emoliente Mono e sesquiterpenos, óleos essenciais, ácidos graxos insaturados	CARDOSO et al., 2004 CARDOSO et al., 2011 KAPOOR; HUNG, 2006 MANHEZI et al., 2008

FONTE: A autora (2018)

O efeito terapêutico do óleo de borage é atribuído à presença dos ácidos graxos (figura 7). Estes ácidos graxos possuem um papel importante na estrutura e fisiologia da pele (HATANAKA; CURI, 2007). São eles: o ALA, que contém 18 Carbonos, duas ligações duplas, uma no C₉ e outra no C₁₂, na posição ω 6 (C 18:2, delta 9,12, ω 6); GLA, que contém 18 Carbonos, três ligações duplas, uma no C₉, uma no C₁₂ e outra no C₁₅, na posição ω 3 (C18:3, 9,12,15, ω 3) e o ácido oleico, que contém 18 Carbonos e uma dupla ligação em C₉ (C18:1, ω 9) (MANHEZI et al, 2008; CARDOSO et al., 2011).

Figura 5 – Borage (*Borago officinalis*)

FONTE: Retirado de Words and herbs (<http://wordsandherbs.files.wordpress.com/2012/10/borage1.jpg>)

No tratamento de feridas, óleos ricos em ácidos graxos auxiliam a eliminação do tecido necrótico, servem como barreira protetora contra microrganismos, evitam a desidratação tecidual, provêm o isolamento térmico e diminuem os traumatismos durante a substituição dos curativos (HATANAKA; CURI, 2007; MANHEZI et al., 2008).

Em relação ao processo de cicatrização, os ácidos graxos que compõem o óleo de borage apresentam papéis diferentes. O ácido linoleico atua como um agente pró-inflamatório por ser precursor de mediadores inflamatórios. Em contato com a pele, se converte lentamente em GLA, que por sua vez, exibe propriedades anti-inflamatórias por inibição da produção destes mediadores (FARAHPOUR; MAVADDATI, 2012).

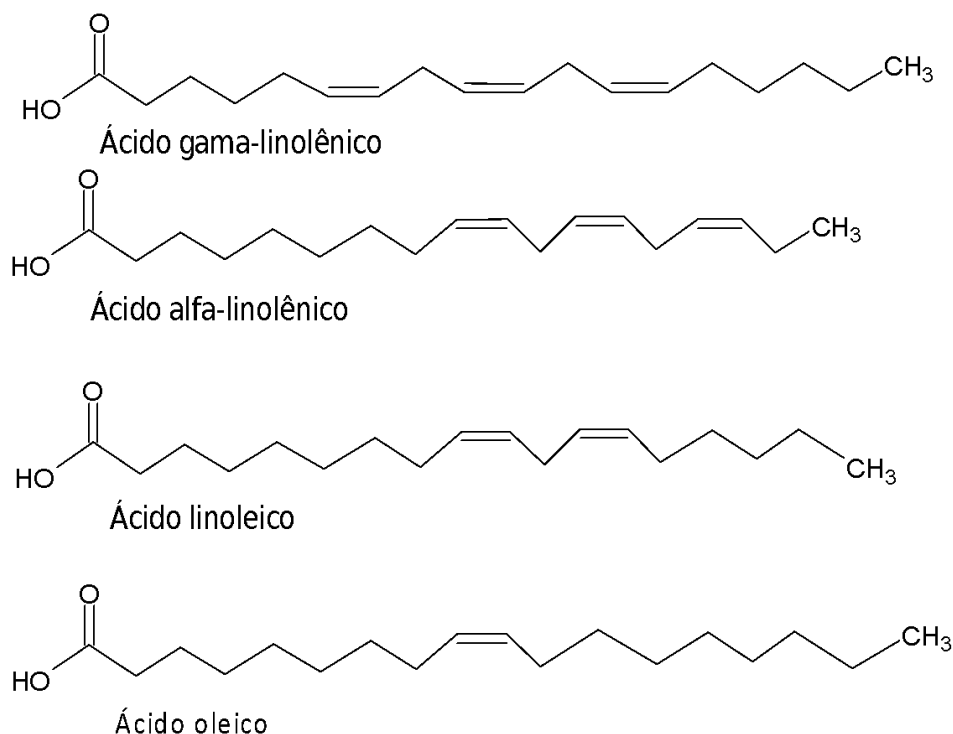
Kapoor e Huang (2006) revisaram o GLA quanto a sua atividade anti-inflamatória e afirmaram que esta substância, apesar de se converter lentamente em um substrato (ácido araquidônico) de enzimas fundamentais para o processo inflamatório, ele compete com este mesmo substrato pelos sítios ativos de enzimas inflamatórias, inibindo-as.

Alguns estudos *in vivo* no período de 21 dias, utilizaram os ácidos graxos separadamente e apresentaram os seguintes resultados: o ácido linoleico acelerou o fechamento da ferida nas primeiras 48 horas, o ácido oleico acelerou a cicatrização após 5 dias, enquanto o ácido γ -linolênico retardou o fechamento da ferida nos primeiros dez dias após a incisão, mas no período seguinte, atuou na aceleração do

processo de cicatrização (CARDOSO et al., 2004; CARDOSO et al., 2011; HATANAKA; CURI, 2007).

No entanto, Farahpour e Mavaddati (2012) estudaram o efeito tópico do óleo de borage (1,5 % m/m) em testes *in vivo* e demonstraram que este é capaz de promover e acelerar o processo de cicatrização, provavelmente, pelo efeito sinérgico entre os ácidos graxos que o compõem.

Figura 7 – Estrutura dos principais ácidos graxos encontrados no óleo de borage



FONTE: A autora (2018)

- Extrato de Jambu

Spilanthus acmella var. *oleracea*, *Acmella oleracea* ou *Spilanthus acmella*, é uma planta nativa de regiões tropicais da Ásia e da América do Sul. Na Índia, é popularmente conhecida como Akkalkara e no Brasil, como Jambu (figura 7) (DIAS et al., 2012; GUPTA et al., 2012). Na medicina popular é usada pura ou como chá para dores de dente, afecções de garganta, gengivas, feridas na boca, aftas e também, para tuberculose, anemia, falta de apetite, malária, raiva, com ação antifúngica, diurética, vaso-relaxante, anti-inflamatória, antibacteriana, anti-hipertensiva, inseticida, anestésica e analgésica (CAVALCANTI, 2008; FAVORETO e GILBERT, 2010; FREITAS, 2014; YAMANE, 2016).

Figura 7 – Jambu (*Spilanthes acmella* var. *oleraceae*)

FONTE: Retirado de FAVORETO; GILBERT (2010)

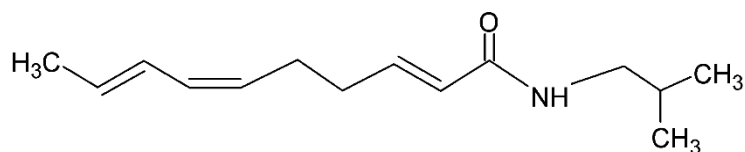
O estudo fitoquímico do Jambu apresentou triterpenoides como: ésteres de α e β -amirina, estigmasterol, β -sitosterol; ácidos graxos: ácido láurico, mirístico, palmítico, linoleico e linolênico; substâncias voláteis: limoneno (23,6%), β -cariofileno (20,9%), (Z)- β -ocimeno (14,0%), germacreno D (10,8%) e mirceno (9,5%); álcool mirístico e N-alquilamidas ou alcanidas: N-isobutilamidas (dentre elas, o espilantol), 2-metilbutilamidas e uma 2-feniletilamida (DIAS et al., 2012; FAVORETO; GILBERT, 2010; FREITAS, 2014; TIWARI et al., 2011).

As atividades biológicas do Jambu são atribuídas ao espilantol ou afinina ((N-2-metilpropil) -2,6,8-decatrienamida ou N-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida)), que é uma alquilamida alifática (Figura 8), descrita como um óleo viscoso ardente, de coloração amarela encontrada principalmente nas flores do Jambu. Pode ser extraído por solventes orgânicos ou por CO₂ supercrítico, sendo este último método de extração mais seletivo para o espilantol (BARBOSA et al., 2016; CAVALCANTI, 2008; DIAS et al., 2017).

O espilantol apresenta atividade biológica semelhante à capsaicina, uma amida extraída da pimenta (*Capsicum spp.*), que possui ação anestésica e analgésica, utilizada para dores musculoesqueléticas e neuropáticas como adesivos ou cremes

nas concentrações de 0,025 a 10% (m/m) (ANAND; BLEY, 2011; FRIAS; MERIGHI, 2016).

Figura 8 – Estrutura do espilantol



FONTE: A autora (2018)

Barbosa et al. (2016) publicaram uma revisão aprofundada sobre o espilantol, contendo os principais estudos sobre sua bioatividade. Em seu uso tópico, pode-se destacar a ação antibacteriana, anestésica, analgésica e anti-inflamatória nas formas de cremes ou filmes nas concentrações de 1 a 10% (m/m) (BONNER et al., 2016; FREITAS-BLANCO et al., 2016; GUPTA et al., 2012).

2.4 Incorporação de bioativos em matrizes poliméricas

A incorporação de substâncias bioativas em matrizes poliméricas apresenta diversos objetivos, tais como: liberação rápida de APIs pouco solúveis em meio aquoso, liberação prolongada de bioativos solúveis em água, proteção de substâncias bioativas, adesão e proliferação celular, produção de materiais com propriedades antimicrobianas e absorção de fluidos. Tais propriedades, quando conferidas a estes sistemas, evitam efeitos colaterais, reduzem a frequência das doses aplicadas, aumentando a qualidade de vida do paciente, através da administração tópica do API (LÓPEZ-PERIAGO et al., 2009; REVERCHON et al., 2009).

Os APIs podem estar dispersos na matriz polimérica ou adsorvidos em sua superfície e a sua liberação pode acontecer por penetração de fluidos na matriz e difusão do API através dos poros do polímero, bem como pela degradação do polímero, ou pela combinação dos dois mecanismos (LYRA et al., 2007).

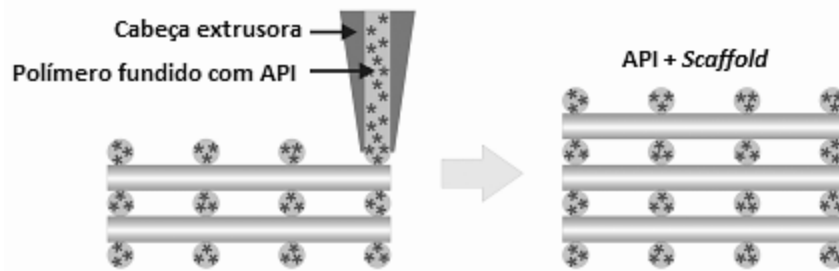
2.4.1 Incorporação de bioativos em matrizes poliméricas por técnicas tradicionais

Existem diferentes maneiras de incorporar substâncias bioativas em matrizes poliméricas. A escolha da técnica dependerá da aplicação (ex. tópico) e características desejadas do produto (ex. biodegradabilidade), do polímero (natural ou sintético) e do agente bioativo a ser incorporado (MARIZZA et al., 2016). Assim, um conhecimento prévio sobre a solubilidade do API no solvente a ser utilizado, bem como seu comportamento na presença da matriz estruturante, torna-se necessário.

Os métodos convencionais utilizados para incorporar os APIs em matrizes poliméricas são (BELHADJ-AHMED et al., 2009; BRAGA et al. 2008; BRAGA et al., 2015; KAZARIAN, 2000; KIKIC; VECCHIONE, 2003; VARONA et al., 2011):

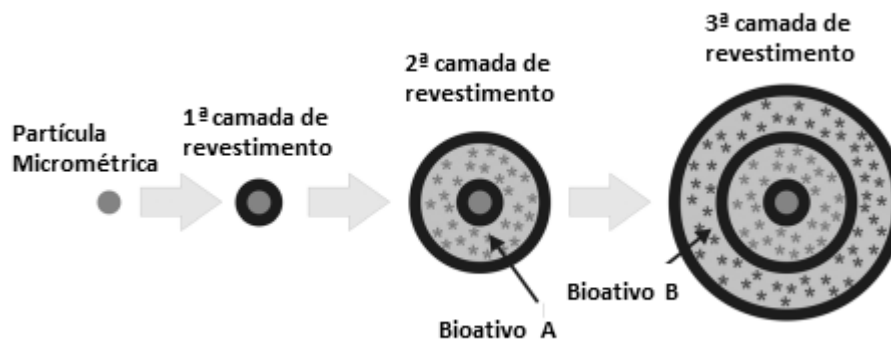
- *Mistura física* – os polímeros e os bioativos são obtidos por meio de técnicas farmacêuticas para a produção de formas sólidas (pulverização, mistura, granulação por via úmida ou seca, secagem e compressão);

- *Mistura simples por fusão do polímero* - as substâncias a serem impregnadas são misturadas na matriz e aquecidas até à fusão (Figura 9). A mistura é resfriada, resultando na incorporação dos compostos em várias formas tridimensionais. Este método é indicado para polímeros com baixo ponto de fusão, a exemplo da policaprolactona (um poli-alfa-éster), cuja temperatura de fusão está entre 55-60°C (ULERY et al., 2012). Apesar das matrizes poliméricas normalmente não se degradarem em altas temperaturas, as substâncias bioativas são mais termicamente lábeis e podem se decompor. Geralmente, os APIs são introduzidos apenas quando as matrizes já estão fundidas. Além disso, o uso de altas temperaturas pode permitir a ocorrência de reações químicas indesejáveis entre os aditivos acrescentados na mistura reacional;

Figura 9 – Incorporação de API por fusão do polímero

FONTE: Retirado de COSTA (2015)

- *Mistura em meio reacional para polimerização ou modificação da matriz* – Neste método, o API é adicionado durante a polimerização, co-polimerização, enxerto (*grafting*) ou reticulação (*cross-linking*) misturado com solventes, catalisadores, reagentes, agentes iniciadores, dentre outros. No decorrer da reação, os APIs ficam fisicamente retidos por oclusão no interior da matriz (figura 10). Este método utiliza temperaturas elevadas, solventes e outras espécies químicas e existe a possibilidade de ocorrência de reações indesejáveis que podem promover a degradação de substâncias e / ou formação de compostos perigosos;

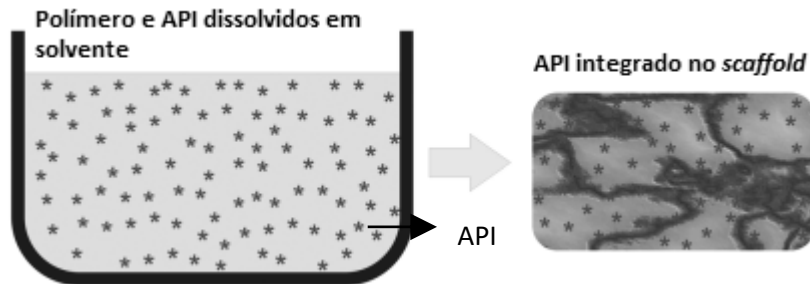
Figura 10 – Incorporação de API por modificação da matriz polimérica

FONTE: Retirado de COSTA (2015)

- *Dispersão ou dissolução em solventes ou agentes dispersantes* - Matrizes e bioativos são dissolvidos ou dispersos em solventes orgânicos ou meios dispersantes, que posteriormente serão removidos por secagem por liofilização, por aquecimento, secagem supercrítica, entre outros (Figura 11). Este processo requer quase sempre a utilização de calor e/ou de vácuo para a remoção de resíduos líquidos. Os solventes

utilizados também podem apresentar problemas de segurança e toxicidade ou podem ser difíceis de remover;

Figura 11 – Incorporação de API por dissolução em solventes

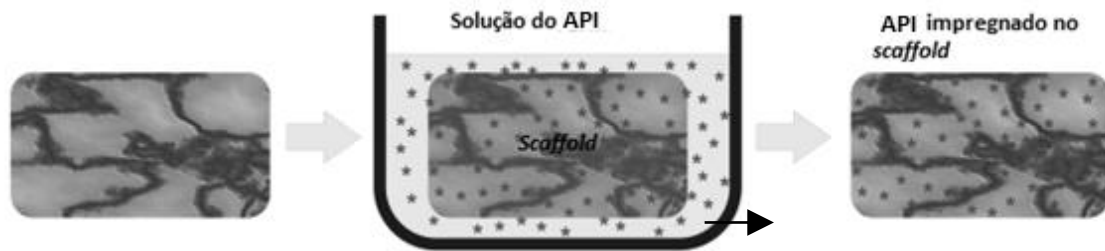


FONTE: Retirado de COSTA (2015)

- *Impregnação por via úmida ou por imersão (soaking)* – O polímero já sintetizado é colocado em contato com um líquido contendo a substância bioativa através de sua imersão ou por meio da adição de determinadas quantidades de líquido (figura 12). A matriz polimérica é insolúvel no líquido, mas deve absorver grandes quantidades de líquidos e inchar, facilitando o processo de difusão dos APIs nesta. Nesse caso, os bioativos são incorporados através de interações específicas (afinidade) com o polímero. Este processo é demorado, heterogêneo e pode ser ineficaz em termos das quantidades incorporadas, devido à baixa difusividade do líquido, baixa capacidade de inchar da matriz e/ou a interações fracas que se estabelecem entre as substâncias e matrizes. O aumento da temperatura pode ser utilizado para melhorar a eficiência da impregnação, mas pode levar à degradação, como também os procedimentos de remoção de líquido e a secagem de materiais.

Em resumo, as principais limitações dos processos acima descritos são: o uso de solventes orgânicos (que podem deixar resíduos e afetar na toxicidade e segurança do produto), a utilização de múltiplas etapas para a remoção dos solventes, bem como, altas temperaturas, o que pode degradar APIs termossensíveis e/ou promover reações químicas indesejáveis (BRAGA et al., 2015; CHAMPEAU et al., 2015a; LÓPEZ-PERIAGO et al., 2009).

Figura 12 – Impregnação de API por via úmida



FONTE: Retirado de COSTA (2015)

Bioativos também podem ser impregnados ou dispersos em matrizes poliméricas por meio de sua mistura em fluidos comprimidos, a exemplo do CO₂ em temperatura crítica ou próxima ao ponto crítico. Este tipo de processo apresenta inúmeras vantagens quando comparado aos métodos tradicionais citados anteriormente. Os processos usando tecnologia com fluido supercrítico oferecem a possibilidade de operação em temperaturas amenas (308,15 K), sem solventes orgânicos ou com baixas concentrações dos mesmos. Este tipo de impregnação será melhor explorado na seção seguinte.

2.4.2 Incorporação de bioativos utilizando CO₂ supercrítico

O uso de dióxido de carbono supercrítico para incorporação de bioativos é uma alternativa ao uso de solventes orgânicos, pois favorece o aumento da escala de produção e o atendimento aos requisitos de tecnologia limpa e sustentável (PERRUT; CLAVIER, 2003; KNEZ et al., 2014). A implementação industrial do processo de impregnação foi validada para o tratamento antifúngico em madeiras, tingimento têxtil e na extração de óleo essenciais na indústria cosmética e de perfumaria. Espera-se que em breve ocorra na área biomédica, uma vez que muitos estudos em sistemas de liberação controlada e engenharia de tecidos sugerem vantagens no uso de tecnologia supercrítica (AREERAT et al., 2004; AROSO et al., 2015; BARROS et al., 2017; CHAMPEAU et al., 2015a; KAZARIAN et al., 1996; KIKIC, 2009; WEDNER, 2017).

Antes de abordar este processo, contudo, algumas definições sobre os fluidos supercríticos são necessárias.

Uma substância pura encontra-se em estado supercrítico quando suas condições de temperatura e pressão estão acima do ponto crítico no diagrama de fases PT – pressão e temperatura (Figura 13.A). O ponto crítico é o último ponto da linha de transição entre líquido e gás, ou seja, o limite superior da curva de pressão de vapor, onde os estados líquido e gasoso de uma substância pura podem coexistir em equilíbrio (BRUNNER, 1994). Acima deste ponto, não há mais distinção entre as fases ou tensão superficial, formando uma fase com aspecto macroscópico homogêneo e opalescente. Em resumo, o gás não pode ser liquefeito por aumento da pressão à temperatura constante, nem o líquido pode ser vaporizado por redução da pressão à temperatura constante (BRUNNER, 1994; CAVALCANTI, 2008; JIMÉNEZ et al., 2007; KOPCAK, 2003; PASQUALI; BETINNI, 2008).

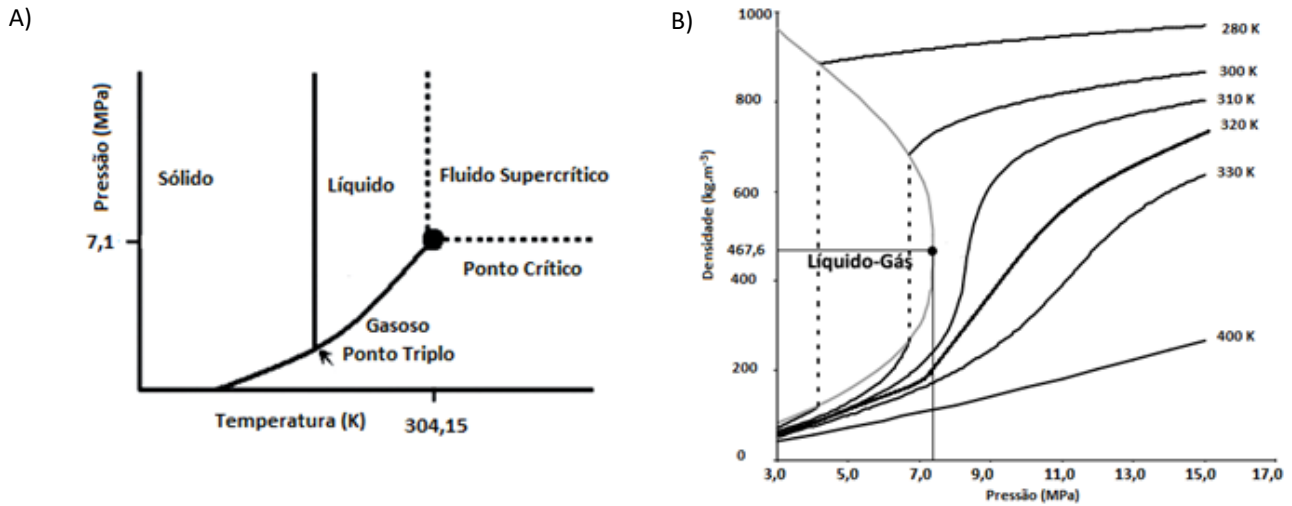
No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas do fluido apresentam valores intermediários entre líquido e gás e, por isso, desejáveis para o desenvolvimento eficiente e versátil de inúmeros processos. Por exemplo, assemelham-se às propriedades dos gases em compressibilidade, baixa viscosidade ($3-7 \times 10^{-5} \text{ N.s.m}^{-2}$) e alta difusividade ($10^{-7}-10^{-8} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$). Estas últimas proporcionam aos fluidos supercríticos, uma alta capacidade de transferência de massas (CAVALCANTI, 2008; JIMÉNEZ et al., 2007; KOPCAK, 2003; REVERCHON; ADAMI, 2008).

Os fluidos supercríticos comportam-se como líquidos quanto aos valores de densidade ($0,6 - 1,0 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}$), que os tornam capazes de solvatar outras moléculas. A solubilidade de uma substância em um solvente está relacionada com as forças intermoleculares. Esta interação entre soluto e solvente ocorre pela aproximação entre as moléculas, dependendo desta maneira da densidade. Por isso, os fluidos supercríticos, quando densos, solubilizam melhor os solutos (CARRILHO et al., 2001; CAVALCANTI, 2008; DUARTE et al., 2009a; MARTINS et al., 2013; REVERCHON; ADAMI, 2008).

Na Figura 13, pode-se verificar as relações entre pressão e temperatura (13.A) e pressão, densidade e temperatura (13.B). É possível observar que alterações significativas na densidade do dióxido de carbono ocorrem com pequenas variações de temperatura e/ou pressão nas proximidades do ponto crítico. Estas mudanças estão relacionadas à organização e distribuição dinâmica do fluido e pode explicar também a

compressibilidade dos fluidos (CANSELL et al., 2003; DUARTE et al., 2009a; PASQUALI; BETINNI, 2008).

Figura 13 – Diagramas de fase do CO₂: A) Pressão × Temperatura e B) Densidade × Pressão



FONTE: A autora (2018)

A tabela 3 apresenta algumas substâncias e suas respectivas propriedades críticas (P_c e T_c). Os valores de P_c e T_c podem aumentar com a massa molar, ligações intermoleculares de hidrogênio ou polaridade (PASQUALI; BETINNI, 2008). Embora todas as substâncias possam alcançar o estado supercrítico, nem todas são apropriadas para aplicações industriais e sua escolha depende de suas propriedades, custo e aplicação (DUARTE et al., 2009a). Pode-se citar o exemplo da água, cuja transição para o estado supercrítico ocorre a temperatura elevada, podendo alterar estruturas de moléculas termossensíveis ou mesmo elevar significativamente o gasto energético do processo nas indústrias.

Entre os potenciais fluidos supercríticos, o dióxido de carbono (CO₂) é considerado a melhor opção, pois apresenta vantagens como: temperatura crítica baixa e pressão crítica moderada (304,15 K e 7,4 MPa), o que permite sua utilização com materiais termossensíveis, não é inflamável, apresenta baixa toxicidade, é um solvente *GRAS* (*Generally Recognized as Safe* - Geralmente Considerado como Seguro) e relativamente inerte. Além disso, é ambientalmente benigno já que pode ser descartado para o ambiente em pequenas quantidades ou reutilizado ao final do processo (VYAS et al., 2009).

Tabela 3 - Propriedades físicas de alguns fluidos

Substância	T _c (K)	P _c (MPa)
Metano (CH ₄)	190,4	4,6
Etano (C ₂ H ₆)	305,3	4,5
Propano (C ₃ H ₈)	369,8	4,2
Etileno (C ₂ H ₄)	282,4	5,0
Dimetil Éter (C ₂ H ₆ O)	400,0	5,2
Dióxido de Carbono (CO ₂)	304,1	7,4
<i>n</i> -Hexano (C ₆ H ₁₄)	507,5	3,0
Amônia (NH ₃)	132,5	11,3
Metanol (CH ₄ O)	512,6	8,1
Etanol (C ₂ H ₆ O)	514,0	6,3
Acetona (CH ₃ COCH ₃)	508,1	4,7
Água (H ₂ O)	374,0	21,9

FONTE: NIST (2016)

O CO₂ é constituído por moléculas de geometria linear, de carácter apolar e baixa polarizabilidade, no entanto, apresenta um forte quadrupolo. Comporta-se como um ácido fraco de Lewis (receptor de par de elétrons), embora tenha algumas características de base fraca, devido ao seu quadrupolo. O quadrupolo do CO₂ ocorre por causa da deslocalização de elétrons para os átomos de oxigênio, havendo uma separação parcial de cargas entre o carbono, que se comporta como um ácido fraco de Lewis com carga parcial positiva e os dois átomos externos de oxigênio, que se comportam como bases fracas de Lewis com cargas parciais negativas (BRAGA et al., 2015; JACOBS, 2004; KOPKAK; MOHAMED, 2005; LANG; WAI, 2001).

Em geral, a solubilidade de um soluto no CO₂ depende da presença de grupos funcionais, peso molecular e polaridade: compostos apolares ou de baixo peso molecular são bem solúveis, compostos levemente polares ou de médio peso molecular são moderadamente solúveis e substâncias polares ou de alto peso molecular são dificilmente solúveis (BRAGA et al., 2015; JACOBS, 2004; KOPKAK; MOHAMED, 2005; LANG; WAI, 2001).

O CO₂ pode estabelecer interações com base fracas de Lewis e com grupos fenil, etil, metil, carbonil, éster e flúor, bem como com ácidos carboxílicos e aminas, no entanto, com estes últimos podem ocorrer reações químicas (BRAGA et al., 2015).

Para melhorar sua atuação como solvente, principalmente de frações mais polares, é comum a adição de pequenas quantidades de solventes polares (1-5%) denominados de cossolventes para manter ou melhorar a seletividade, enquanto aumentam a solubilidade. Os cossolventes mais utilizados são o metanol e o etanol. Surfactantes como poloxâmeros, polisorbatos ou fosfatidilcolinas também podem ser adicionados para a formação de emulsões ou melhoria da solubilidade (BRAGA et al., 2015; JACOBS, 2004; KOPKAK; MOHAMED, 2005; LANG; WAI, 2001).

2.4.3 Impregnação/Deposição por solvente supercrítico (SSI/SSD)

O processo de Impregnação por Solvente Supercrítico (SSI - *Supercritical Solvent Impregnation* – SSI) / Deposição por Solvente Supercrítico (SSD – *Supercritical Solvent Deposition*) envolve dois mecanismos distintos, mas que em geral ocorrem simultaneamente, descritos a seguir (BARROS et al., 2017; BRAGA et al., 2015; MUSTAPA et al., 2016).

a) Deposição física (SSD)

O CO₂ solubiliza o API e a mistura saturada (API + scCO₂) entra em contato com o polímero, no entanto, o polímero não consegue absorver a mistura em quantidades apreciáveis. A matriz e os poros podem:

- Deformar ligeiramente, devido à alta pressão e a presença do fluido nos poros. Neste tipo de material pode ocorrer uma ruptura de partes e formação de novos poros. A quitosana é um exemplo de polímero com este comportamento;
- Permanecer em sua forma original, sem qualquer alteração estrutural do polímero. Exemplos deste tipo de material são sílicas mesoporosas.

Após a despressurização da célula, caso a matriz e os poros tenham aumentado de volume, estas retornam ao volume inicial (ou quase) e há uma drástica redução da solubilidade do API no fluido. Em consequência, o API se

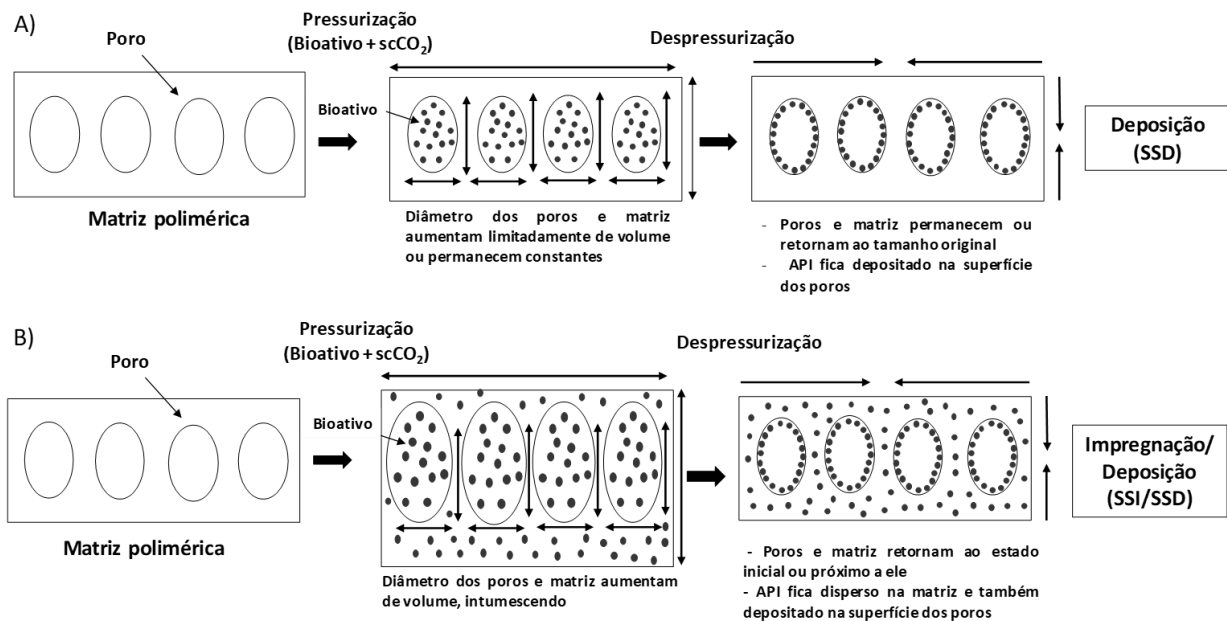
deposita por precipitação na superfície da matriz polimérica e dos poros. O requisito principal para este mecanismo ocorrer é o API ser solúvel em $scCO_2$. Outros fatores que influenciam a deposição são a área superficial, a porosidade e os grupamentos químicos na matriz (KAZARIAN; MARTIROSYAN, 2002; MASMOUDI et al., 2011; MUSTAPA et al., 2016; TKALEC et al., 2015).

b) Impregnação ou dispersão molecular com deposição (SSI/SSD)

O $scCO_2$ solubiliza o bioativo e a mistura (API + $scCO_2$) se difunde através das cadeias poliméricas, reduzindo as interações intermoleculares nas cadeias poliméricas, aumentando a flexibilidade e o volume livre da matriz. Isto permite que a mistura penetre em maior quantidade no interior da matriz, promovendo o intumescimento e o aumento de volume do material (BRISCOE et al., 1994; YU et al., 2013). Após a despressurização, com a redução da solubilidade do bioativo no CO_2 gasoso, uma parte do soluto se deposita na superfície da matriz e dos poros (deposição - SSD) e a outra parte se dispersa, ou seja, impregna o polímero (SSI), devido às interações físico-químicas específicas entre o API e o polímero. A afinidade entre o API e o polímero controla a dispersão e o coeficiente de partição. As interações entre o $scCO_2$ e o polímero também influenciam na impregnação, pois controlam a dilatação da matriz e o efeito plastificante do CO_2 (AROSO et al., 2015; KAZARIAN; MARTIROSYAN, 2002; MASMOUDI et al., 2011; MUSTAPA et al., 2016; TKALEC et al., 2015).

Em resumo, o processo de impregnação/deposição é considerado tecnicamente viável quando a substância ativa é solúvel no fluido supercrítico, a matriz incha pela ação do solvente supercrítico e as afinidades/interações intermoleculares são favoráveis para permitir a transferência do API para o polímero (AROSO et al., 2015). A Figura 14 ilustra os mecanismos de impregnação/deposição supercrítica.

Figura 14 – Mecanismos de impregnação/deposição usando $scCO_2$: A) deposição física (SSD) e B) dispersão ou impregnação com deposição (SSI/SSD)



FONTE: Adaptado de BRAGA et al. (2015)

Experimentalmente, a impregnação/deposição supercrítica consiste de três etapas:

1) Solubilização do API em CO_2 – por meio de uma bomba, o CO_2 é inserido em uma célula de impregnação de alta pressão selada, previamente carregada com a amostra do polímero, o bioativo e o cossolvente (quando utilizado) à temperatura e pressão pré-estabelecidas (próximas ou acima da temperatura e pressão críticas). A agitação magnética é utilizada para solubilizar e homogeneizar o API no $scCO_2$ (e/ou no cossolvente), além de aumentar a velocidade da difusão do fluido no polímero;

2) Contato entre a solução (CO_2 + API) e o polímero – a solução se difunde na matriz polimérica, o que resulta na impregnação do soluto. A difusão é facilitada pelo inchamento do polímero com o CO_2 e, a quantidade do bioativo impregnada depende da sua solubilidade em CO_2 nas condições de temperatura e pressão empregadas;

3) Despressurização - Após um tempo fixo, realiza-se a despressurização e o CO_2 torna-se gasoso, ocorrendo uma expansão controlada do sistema, com velocidade a ser determinada pelo tipo de material utilizado para não promover bolhas ou deformar o polímero. No final, recupera-se a matriz polimérica impregnada e/ou depositada com o

bioativo e livre de solventes (BRAGA et al., 2008; BRAGA et al., 2015; CHAMPEAU et al., 2015a).

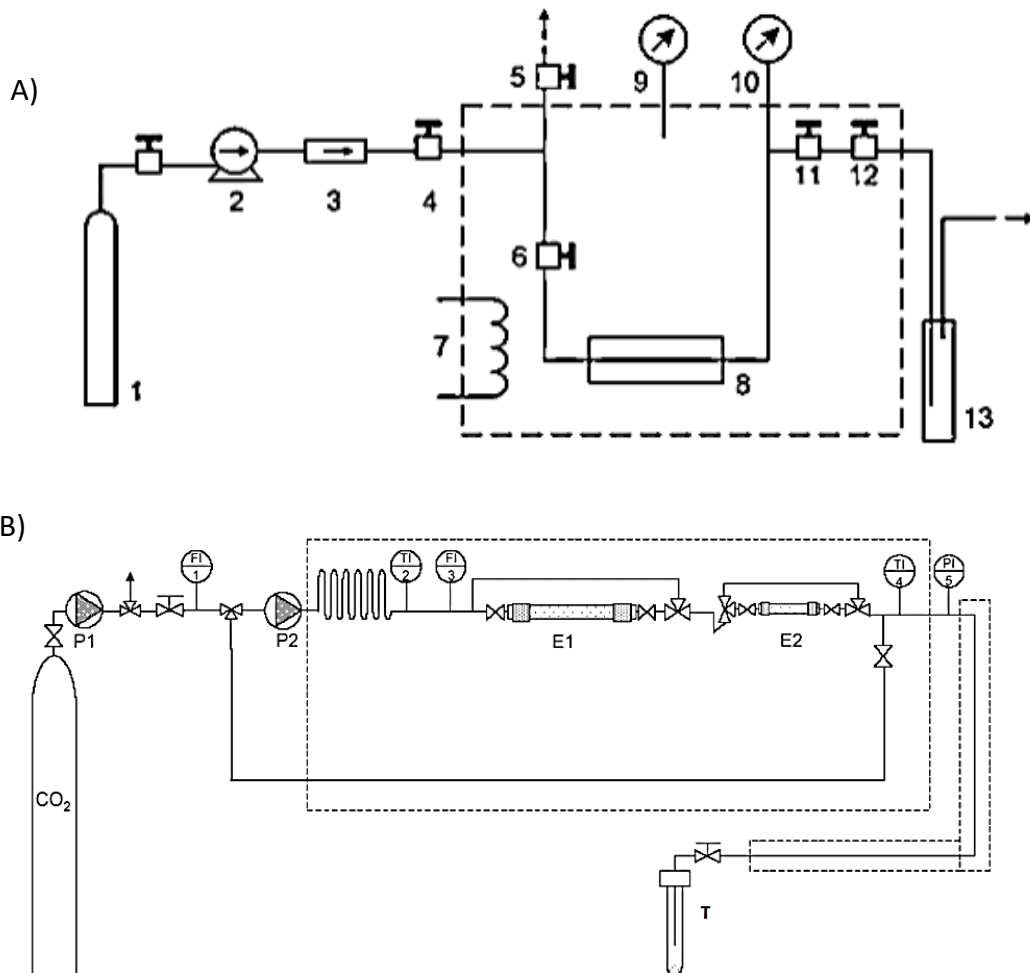
A figura 15 apresenta dois esquemas de SSI/SSD: A) consiste em um esquema genérico de um sistema descontínuo de SSI/SSD, que opera normalmente em temperaturas entre 35-55°C (308,15 - 328,15 K) e pressão de 90 - 200 bar (9 MPa e 20 MPa) para aplicações médicas, no qual, o bioativo e o polímero encontram-se em 8 e; B) um esquema contínuo de impregnação, que consiste basicamente em misturar o API com esferas de vidro em E1 enquanto o polímero se encontra em E2, a bomba P1 pressuriza o sistema e a bomba P2 recircula o CO₂ entre E1 e E2 (CHAMPEAU et al., 2015a; MANNA et al., 2007; VARONA et al., 2011).

Alguns estudos modificam o processo de impregnação/deposição para aproveitar outras propriedades do scCO₂ ou para aumentar a quantidade impregnada de API no polímero como: etapas de impregnação e extração sequenciais e em 3 ciclos para aumentar a eficiência do processo de SSI/SSD (YAÑEZ et al., 2011); extração supercrítica de produtos naturais, seguido de um sistema de SSD/SSI para impregnação de polímeros (FANOVICH et al., 2013).

Na figura 16, pode-se observar a demonstração das etapas do processo de impregnação: a) Na pressurização (antes do CO₂ chegar nas condições de pressão e temperaturas críticas), b) Solubilização e mistura (bioativo + scCO₂), c) Tempo de contato, d) Despressurização. Os diagramas abaixo da demonstração das etapas de impregnação/deposição representam o CO₂ em relação ao polímero e o bioativo. No diagrama I, o API pode formar duas fases com o CO₂, mas acima do ponto crítico, pode se tornar completamente miscível no CO₂. O diagrama II junto com a figura c permitem observar que as propriedades do polímero como temperatura de transição vítrea, ponto de fusão e o intumescimento podem mudar com alterações de pressão e temperatura. O diagrama III apresenta a diferença de pressão e temperatura do CO₂ antes e após a despressurização do sistema, o ponto 1 da curva da temperatura no período de contato entre a mistura e o polímero (T contato) representa a fase fluida e o ponto 2, a coexistência entre líquido e gás. No ponto 3 da curva da temperatura de CO₂ na despressurização (T despressurização), pode-se verificar a redução da temperatura do CO₂, devido ao efeito Joule Thomson, que ocorre quando um gás, para se expandir, é obrigado a passar por uma válvula e, caso haja cossolvente, pela evaporação deste. No

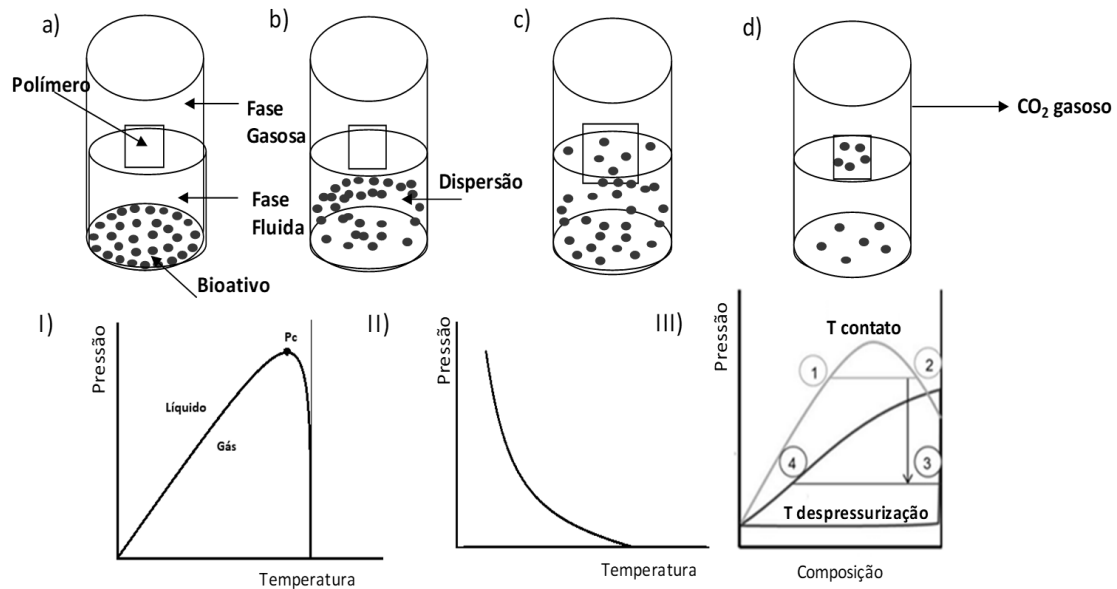
ponto 4, há ainda uma pequena quantidade de CO₂ no sistema, apesar do gás ter saído quase completamente (WEIDNER, 2017).

Figura 15 – Esquemas de sistemas descontínuo e contínuo de SSI/SSD: A) Esquema genérico de um sistema de SSI/SSD descontínuo: 1) reservatório de CO₂, 2) bomba de CO₂ de alta pressão, 3) válvula anti-retorno, (4,5,6,11 e 12) válvulas, 7) banho de água termostaticado, 8) célula de impregnação, 9) termômetro, 10) transdutor de pressão e 13) trap; B) Esquema genérico de um sistema de SSI/SSD contínuo: 1 e 3) Indicador de fluxo de CO₂, 2 e 4) Indicador de temperatura, 5) indicador de pressão, P1 e P2 são bombas, E1: vaso de saturação, E2: vaso de impregnação, T: trap



FONTE: Retirado de A) NATU et al. (2008) e B) MANNA et al. (2007)

Figura 16 – Esquema das etapas de impregnação/deposição: a) início da pressurização, b) solubilização do API em scCO₂, c) tempo de contato, d) depressurização. Os diagramas P x T representam: I) etapa em que CO₂ torna-se um fluido supercrítico; II) etapa de sorção do CO₂ no polímero e III) etapa de impregnação e depressurização.



FONTE: Adaptado de WEIDNER (2017)

Um entendimento mais aprofundado do processo de impregnação/deposição supercrítica depende do conhecimento dos fenômenos de transporte das moléculas através da matriz polimérica. Para tanto, as definições de difusão e sorção são necessárias para o entendimento desse processo.

2.4.3.1 Fundamentos de transporte de massas associados a polímeros

Quando uma substância se move através de uma matriz polimérica, a força motriz para a transferência de massa é a diferença de concentração. Conseqüentemente, a difusividade e sua solubilidade no entorno da matriz são as duas principais interações que governam a taxa de transporte (HAN, 2000; HE et al., 2014).

Para processo com difusão de fluidos e gases, a Lei de *Fick* é a relação matemática mais conhecida e utilizada para correlacionar fluxo de difusão e gradiente de concentração, devido a sua simplicidade (HE et al., 2014). *Fick* (1855) formulou duas leis fundamentais de difusão, que são válidas para materiais isotrópicos e são baseadas na observação de que o fluxo da espécie que se difunde é proporcional ao gradiente de concentração, estabelecendo uma relação linear (FELISBERTI, 1985; JESPERSEN, 2002; PEREIRA, 2015):

$$F = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (1)$$

Onde:

F = velocidade de transferência de material por unidade de área

C = concentração da substância em difusão

x = coordenada normal à secção

D = coeficiente de difusão. O sinal negativo significa que a difusão ocorre na direção oposta ao aumento de concentração.

Para um sistema em regime transiente com fluxo unidirecional e espessura muito menor que outras dimensões, é utilizada a 2ª lei de Fick. No caso, adota-se o modelo de difusão em placa, ou seja, considera-se uma geometria retangular e o coeficiente de difusão constante (equação 2) (CRANK, 1975; PEREIRA, 2015; JESPERSEN, 2002):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2)$$

Onde:

C = concentração da substância que se difunde

t = tempo de difusão, x é a coordenada espacial perpendicular à secção de fluxo

D = coeficiente de difusão.

A equação 2 pode ser resolvida pelo método de separação de variáveis:

$$C(x, t) = X(x) \cdot T(t) \quad (3)$$

As derivadas parciais são:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = X \frac{\partial T}{\partial t} \quad (4)$$

$$\frac{\partial C}{\partial x} = T \frac{\partial X}{\partial x} \quad (5)$$

Ao substituir na 2ª Lei de Fick, tem-se:

$$X \frac{\partial T}{\partial t} = D \cdot T \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} \quad (6)$$

↓

$$\frac{1}{D \cdot T} \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{1}{X} \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} \quad (7)$$

Ao separar as diferenciais, tem-se a equação do lado esquerdo da igualdade em função do tempo e a equação do lado direito da igualdade em função da distância. Por x e t poderem variar independentemente, cada lado da equação pode ser igualado a uma constante arbitrária $-\lambda^2$, resolvendo as duas equações a seguir:

$$\frac{1}{D \cdot T} \frac{\partial T}{\partial t} = -\lambda^2 \quad (8)$$

$$\frac{1}{X} \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} = -\lambda^2 \quad (9)$$

Ao resolver estas equações, deve-se considerar como condições iniciais e de contorno:

$$C = C_0; 0 < x < l, t = 0$$

$$C = 0; x = 0, x = l, t > 0$$

Onde:

C_0 = concentração inicial de CO_2 na amostra

l = espessura do polímero, tem-se:

$$C(t) = \frac{8C_0}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[- \left(\frac{(2n+1)\pi}{h} \right)^2 D \cdot t \right] \quad (10)$$

Como $C(t)/C_0 = M(t)/V(t)/M_0/V_0$ onde M é a massa de CO_2 e V é o volume total da amostra intumescida, considerando que o volume não altera com o tempo ($V(t) = V_0$) e a espessura da amostra é uma constante igual a l que é a espessura da amostra em $t=0$, pode-se obter a seguinte equação:

$$M(t) = \frac{8M_0}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[- \left(\frac{(2n+1)\pi}{l} \right)^2 D \cdot t \right] \quad (11)$$

Onde:

D = coeficiente de difusão

l = espessura do polímero

$M(t)$ = massa de difusão de substância no tempo t

M_0 = massa da difusão de substância em $t = 0$

O coeficiente de difusão pode também ser entendido como a resistência na transferência de massa através do material polimérico (FELISBERTI, 1985).

Os valores de D e M_0 de CO_2 presentes no polímero podem ser determinados pela solução analítica da equação 11, truncando-a no segundo termo (se a curva de desorção apresentar comportamento aproximadamente linear em curto período de tempo), utilizando os dados experimentais da sorção de CO_2 na matriz polimérica e uma rotina computacional, a partir do algoritmo simplex de *Nelder-Mead* (PEREIRA, 2015).

Em Silva et al. (2016), a solução numérica da equação 11 foi também realizada, utilizando o método das diferenças finitas, rotina computacional e o algoritmo de simplex de *Nelder-Mead*, com vistas na otimização dos resultados, que minimizam a função objetivo baseada no somatório do quadrado dos erros relativos das massas de CO_2 calculada e experimental da curva de desorção, como mostra a Equação 12:

$$F_{\text{obj}} = \frac{\sum (m_{\text{exp}} - m_{\text{cal}})^2}{\sum m_{\text{exp}}^2} \quad (12)$$

Onde:

m_{exp} = massa de CO_2 medida experimentalmente

m_{cal} = massa de CO_2 calculada

Apesar de ser bastante utilizada, nem sempre a teoria de difusão de *Fick* consegue explicar a difusão em polímeros, que dependerá da estrutura do polímero (JESPERSEN, 2002).

Para explicar os outros casos de difusão, pode-se dividir os polímeros de acordo com o mecanismo de difusão em três grupos: difusão Fickiana (caso I), já apresentada acima, é normalmente encontrada em polímeros borrachosos; o caso II e o caso III ou difusão anômala (JESPERSEN, 2002; PEREIRA, 2015).

A verificação do tipo de difusão que ocorre nos polímeros pode ser realizada por uma relação conhecida como Lei das Potências (Equação 13):

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = a t^n \quad (13)$$

Onde:

$M(t)$ e M_{∞} = quantidades de substâncias liberadas no tempo

a = constante relacionada às características do sistema

n = indica o mecanismo de transporte. O valor do expoente de liberação (n), calculado por esta equação, está relacionado com o comportamento da matriz polimérica. No caso de polímeros finos, para tempos curtos, quando $M(t)/M_{\infty} < 0,6$, quando o valor de n for igual a unidade ($n=1$), a taxa de difusão do CO_2 é independente do tempo, correspondendo a uma cinética de ordem zero, também conhecida como transporte caso-II, onde difusão é controlada pelo intumescimento e desestruturação do filme. Quando n for igual a 0,5, o mecanismo é controlado pelo coeficiente de difusão e tem-se um transporte fickiano do tipo I. Valores de n entre 0,5 e 1,0 característicos do transporte anômalo (PEREIRA, 2015; SIEPMANN e PEPPAS, 2001).

Um outro conceito essencial para entender o transporte de massas é a sorção. O termo sorção é usado para descrever o fenômeno de penetração e dispersão das moléculas do fluido em sólidos poliméricos e um acúmulo de moléculas na superfície e os poros do material, formando uma mistura com uma ou duas fases. Na sorção, dois processos ocorrem: a adsorção e absorção (FELISBERTI, 1985).

A adsorção é a retenção de moléculas em uma superfície e dependendo da natureza das interações, entre o adsorvente (superfície) e adsorvato (moléculas acumuladas), pode ser classificada como química (ligações covalentes) ou físicas (forças de Van der Waals) (FELISBERTI, 1985).

A absorção é um fenômeno em que moléculas de uma ou mais substâncias penetram em uma outra fase líquida ou sólida. Pode ser física, quando se solubiliza ou se dispersa na fase, sem alteração química ou, química quando ocorre reação entre o adsorvente e o absorvido (FELISBERTI, 1985; SEADER; HENLEY, 2006).

O processo de sorção em polímeros é acompanhado do aumento da massa e do volume do polímero. No caso de substâncias de baixo peso molecular, o processo não é simples, depende da estrutura polimérica e das interações entre o polímero e a(s) substância(s) penetrante(s) (FELISBERTI, 1985; PEREIRA, 2015). A sorção pode ocorrer pelos seguintes mecanismos (FELISBERTI, 1985; JESPERSEN, 2002; PEREIRA, 2015):

- Sorção de *Henry* - as principais interações ocorrem entre as cadeias poliméricas de polímeros amorfos. Este modo estabelece uma relação linear entre a concentração da espécie no meio e sua pressão parcial, conforme mostra a Equação 14.

$$C_D = k_D P$$

Onde:

C_D = concentração da espécie penetrante

k_D = coeficiente de solubilidade

P = pressão parcial da espécie penetrante

- Sorção de *Langmuir* - ocorre quando há predominância de interações entre o polímero e a espécie penetrante (Equação 15). A difusão ocorre em locais específicos no polímero, a exemplo das microcavidades.

$$C_H = \frac{C'_H b P}{1 + b P} \quad (15)$$

Onde:

C'_H = constante de saturação do orifício

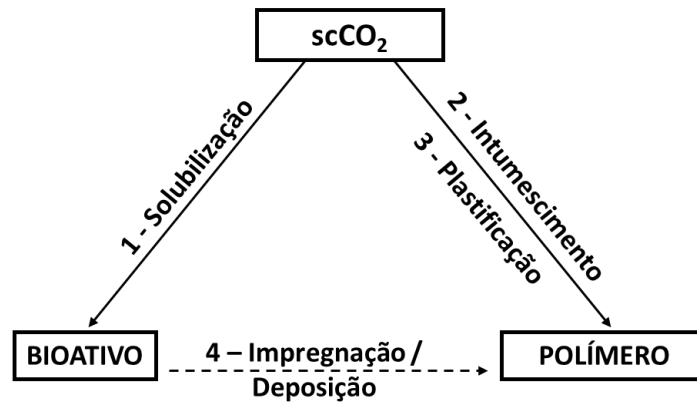
b = constante de afinidade.

- Modo dual de sorção - é composto pelos modos de *Henry* e *Langmuir*, comum em polímeros vítreos ou cristalinos, onde o coeficiente de difusão é baixo. A difusão das moléculas é descrita pela dissolução normal (difusão nos domínios da lei de *Henry*) e pela difusão em microcavidades (difusão nos domínios de *Langmuir*).

2.4.3.2 Interações no processo de impregnação/deposição supercrítica entre polímero-bioativo e $scCO_2$

O estudo das interações entre os componentes do processo SSI/SSD é necessário para obter o maior rendimento possível de impregnação ou deposição da substância bioativa na matriz polimérica. A seguir, as interações binárias $scCO_2$ -polímero, API- $scCO_2$, e API-polímero são discutidas. Na figura 17, encontram-se as interações que ocorrem neste processo.

Figura 17 – Interações entre bioativo, $scCO_2$ e matriz polimérica em SSI/SSD



FONTE: Adaptado de KIKIC; VECCHIONE (2003)

A natureza química das interações entre polímero-bioativo e scCO_2 envolvidas no processo de impregnação/deposição podem ser forças de van der Waals - (dipolo-dipolo), interações com íons (íon-dipolo) e ligações de hidrogênio. O estabelecimento destas interações determina a solubilidade, o coeficiente de partição e outras propriedades. Além destas interações, outros fatores como propriedades morfológicas e de superfície (porosidade, diâmetro de poro e área superficial), adicionadas às propriedades termofísicas e de transporte dos fluidos (densidade, polaridade, tensão superficial, difusividade e viscosidade), podem ser também cruciais para a incorporação de APIs em matrizes poliméricas. Existem ainda outras condições do processo, como o tempo de operação e a velocidade de despressurização, que podem ser também muito relevantes para a eficiência global do processo SSI/SSD (BRAGA et al., 2015; MASMOUDI et al., 2011).

2.4.3.2.1 Interação polímero - scCO_2

Alguns fatores podem afetar a interação entre o CO_2 e a matriz polimérica, a exemplo da temperatura, pressão, natureza do polímero, presença de plastificantes, cristalinidade e reticulação do polímero (FELISBERTI, 1985).

Efeitos da temperatura e pressão

O processo de difusão depende do movimento das cadeias poliméricas. Com o aumento de temperatura, há uma maior mobilidade das cadeias e um aumento dos espaços livres com conseqüente aumento na velocidade de difusão. No entanto, devido ao aumento da entropia do sistema (o aumento da agitação das moléculas de CO_2 e os choques entre as moléculas e entre elas e os poros do polímero), a sorção diminui com

o aumento de temperatura (BRANTLEY et al., 2000; CHAMPEAU et al., 2015a; DUARTE et al., 2005; DUARTE et al., 2009b; FELISBERTI, 1985; KAZARIAN et al., 1998).

Com relação ao aumento de pressão, em sistemas com forte interação entre o CO₂ e o polímero, há um aumento de sorção e conseqüente intumescimento da matriz. No entanto, devido à dificuldade de mobilidade das cadeias poliméricas em decorrência do efeito compressivo e de repulsão entre as moléculas, uma vez que há uma maior quantidade de CO₂, há uma diminuição no coeficiente de difusão (FELISBERTI, 1985).

Natureza do polímero

A composição e a estrutura dos polímeros afetam a difusão do CO₂ na matriz polimérica. O aumento da densidade de polímeros amorfos diminui a difusão devido à diminuição do volume livre, bem como o aumento das saturações que tornam as cadeias menos flexíveis (FELISBERTI, 1985).

Plastificantes

Plastificantes são, normalmente, substâncias orgânicas de peso molecular entre 300-600 e de cadeia linear ou cíclica (14 a 40 carbonos). São usados como aditivos na indústria de polímeros, com o objetivo de modificar propriedades mecânicas (aumentam a flexibilidade e maleabilidade). Além de reduzirem a tensão de deformação, dureza, densidade, viscosidade e cargas eletrostáticas do polímero, aumentam a resistência a fraturas. O pequeno tamanho relativo da molécula do plastificante (em comparação às cadeias poliméricas) permite que esta ocupe os espaços intermoleculares, reduzindo as forças secundárias entre as cadeias do polímero. Alteram também a organização tridimensional das moléculas, reduzindo a energia requerida para o movimento da molécula e a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias, o que aumenta o espaço livre e a mobilidade da molécula, facilitando a difusão do bioativo na matriz polimérica (KIKIC, 2009; NALAWADE et al., 2006; ÜZER et al., 2006; VIEIRA et al., 2011).

Cristalinidade e Reticulação

A sorção e a difusão dependem do grau de cristalinidade do polímero, pois quanto maior a cristalinidade, menor será a flexibilidade de cadeias poliméricas e

consequentemente menos difusão ocorrerá. As regiões cristalinas, por serem difíceis de permear, impedem a sorção do fluido. A reticulação também pode dificultar o processo de difusão e absorção do fluido devido à menor flexibilidade de cadeias, no entanto, não afeta a adsorção (FELISBERTI, 1985).

A fim de obter mais informações sobre os mecanismos de sorção envolvidos e as influências das propriedades do polímero, como a mobilidade da cadeia e o volume livre ou efeitos plastificantes, vários métodos foram testados para investigar as mudanças volumétricas da matriz de polímero durante a sorção de moléculas. Com relação ao grau de intumescimento (ou *swelling*), este pode ser medido por meio das mudanças de espessura em uma ou mais dimensões com o uso de uma vídeo-câmera ou um catetômetro ou por mudanças gravimétricas (FLICHY et al., 2002; TOMASKO et al., 2003; WISSINGER; PAULAITIS, 1987).

Já para medir a sorção de scCO_2 no polímero, alguns métodos utilizados são:

- Método barométrico ou por decaimento de pressão – É uma técnica simples e barata, na qual a amostra do polímero é colocada em contato com CO_2 e isolada em uma célula de alta pressão. A massa de CO_2 absorvida pelo polímero é obtida pela diferença entre a quantidade inicial do fluido na célula e a quantidade remanescente do CO_2 após o equilíbrio (DAVIS, 2004; LIU; TOMASKO, 2007; TOMASKO et al. 2003);
- Método gravimétrico – o método gravimétrico simples foi descrito por Berens *et al.* (1992). Determina a mudança de massa por meio da dessorção da amostra do polímero, após ser retirada da célula de alta pressão para uma microbalança na temperatura ambiente (Figura 18). A previsão da quantidade de CO_2 presente no polímero é estimada pela extrapolação da curva de dessorção (massa dessorvida x tempo) para o tempo zero. Apesar de existirem métodos mais precisos utilizados para a medição da sorção de CO_2 no material, o presente método é simples, robusto e barato, e permite a predição do comportamento do CO_2 na matriz polimérica com boa precisão (DUARTE et al., 2005; TOMASKO et al., 2003).

A figura 19 apresenta um esquema de um equipamento de alta pressão utilizado em procedimento gravimétrico simples para dessorção. A amostra polimérica, previamente pesada, é colocada em uma célula inox de alta pressão e de fácil abertura. Esta é imersa em um banho termostático de ar ou água. A seguir, o CO_2 é

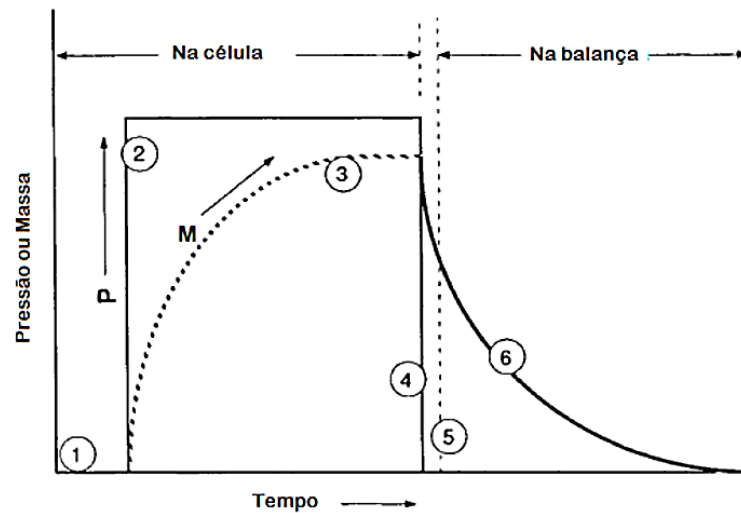
bombeado para dentro do sistema até a pressão desejada. Depois de um certo tempo, a célula é aberta rapidamente e a amostra transferida para a balança para registro da variação da massa durante a dessorção (BERENS et al., 1992).

Além do método gravimétrico simples, vários trabalhos têm utilizado outros tipos de balança como:

- a) A microbalança eletrônica sensível localizada dentro da célula e que mede diretamente a massa de CO₂ absorvida e tem como vantagens a pequena quantidade de amostra de polímero utilizada, além da alta sensibilidade (KAMIYA et al., 1998; WISSINGER; PAULAITIS, 1987);
- b) A balança de suspensão magnética que apresenta além das vantagens da balança *in situ*, o fato da amostra e a balança serem mecanicamente isoladas. A diferença de peso é determinada através da medição da força necessária para suspender a amostra por levitação magnética. A amostra permanece dentro da célula de alta pressão, enquanto a balança encontra-se em temperatura ambiente sem contato com a amostra. Uma suspensão magnética acoplada controlada eletronicamente transmite o sinal para a balança (SATO et al., 2001) e;
- c) A microbalança de cristal de quartzo, que utiliza o método baseado no efeito piezo-elétrico, no qual um cristal de quartzo é revestido com o polímero e colocado entre dois eletrodos de metal, que estabelecem um campo elétrico alternado através do cristal. A vibração emitida, à medida que o polímero absorve o CO₂, é registrada (AUBERT, 1998; TOMASKO, 2003; YU et al., 2013).

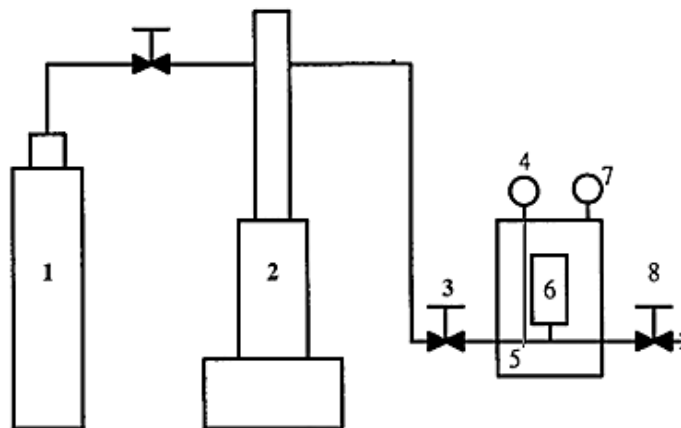
Figura 18 – Curva esquemática para pressão ou massa X tempo de duração dos experimentos de sorção/dessorção em polímeros. Em (1) Carregamento da célula de alta pressão com a amostra; (2) Pressurização com CO₂; (3) Absorção de CO₂ pelo polímero; (4)

Despressurização rápida; (5) Transferência da amostra para a balança; (6) Registro da massa durante a dessorção



FONTE: Adaptado de BERENS et al. (1992)

Figura 19 – Diagrama genérico de um aparato para experimentos de sorção de CO₂: 1) cilindro de CO₂; 2) bomba de alta pressão; 3) Válvula de retenção 4) Indicador de pressão; 5) Banho com temperatura constante; 6) Célula de alta pressão; 7) Indicador de temperatura; 8) Válvula para despressurização



FONTE: Retirado de TANG et al. (2004)

- Métodos espectroscópicos para medição de sorção de CO₂ e inchamento do polímero -

Estes métodos são capazes de determinar simultaneamente a sorção de CO₂ e o inchamento do polímero, além de ser uma das principais ferramentas para estudar as interações moleculares entre os componentes do sistema. As principais técnicas são de infravermelho por transformada de Fourier próximo, médio e por reflectância total atenuada (CHAMPEAU et al., 2014). A partir da comparação dos espectros do polímero com e sem CO₂ e do CO₂ puro, os dados são obtidos. As bandas características do CO₂

são em 660 e 2338 cm^{-1} . Ao aumentar a quantidade de CO_2 , há uma diminuição da banda de absorção do polímero, devido à redução da densidade deste e uma aumento na intensidade da banda do CO_2 (2338 cm^{-1}). Para polímeros com afinidade com o CO_2 , inchamento é calculado pela variação da área da banda característica do polímero na presença de CO_2 e a sorção a partir da altura da banda do CO_2 (2338 cm^{-1}) (KIKIC, 2009).

2.4.3.2.2 Interação API - scCO₂

O estudo da solubilidade de agentes bioativos em scCO₂ é uma etapa preliminar e de grande importância para o desenho experimental do processo de impregnação/deposição supercrítica e pode ser utilizado para avaliar a compatibilidade do fluido supercrítico para uma determinada aplicação, determinar as melhores condições de operação dos fluidos em processo específico e estabelecer a temperatura e pressão otimizadas, além da técnica de medição experimental a ser aplicada (ABDULLAH, 2007).

A capacidade de solubilização de APIs em meio supercrítico pode ser definida como a concentração (m/m) ou fração molar de uma substância ou substâncias na fase supercrítica, a uma dada pressão e temperatura no estado de equilíbrio. Muitos trabalhos, que apresentam dados de solubilidade de diversos bioativos em scCO₂, têm sido publicados (ABDULLAH, 2007; BARTLE et al., 1991; GUPTA; SHIM, 2007; ŠKERGET et al., 2011).

Existem diferentes métodos para a medição da solubilidade de compostos em dióxido de carbono supercrítico que podem ser divididos em: estáticos e dinâmicos. Nos métodos estáticos, o soluto e o solvente são colocados em uma célula por um determinado tempo até alcançar o equilíbrio, dependendo da amostra e do tipo de célula, podem ser classificados ainda como analítico e sintético. O método analítico consiste em uma célula de volume constante com uma quantidade de fluido conhecida. Após o equilíbrio, uma pequena quantidade do fluido é retirada e analisada por HPLC ou outro método de análise como espectroscopia ultravioleta, visível e infravermelho próximo. O método sintético consiste em uma célula de volume variável, com janela de safira para visualização, com soluto e solvente em quantidades conhecidas e com

condições que gradualmente reduzem a solubilidade até causar precipitação (ponto de orvalho), que é registrado (ABDULLAH, 2007; GUPTA; SHIM, 2007).

No método dinâmico, o recipiente é cheio com um soluto e o fluido supercrítico flui continuamente através do recipiente. O fluxo de saída é então analisado para a concentração de soluto por técnicas cromatográficas, espectroscópicas, gravimétricas, dielétricas e outras (ABDULLAH, 2007).

Normalmente, as temperaturas utilizadas para estudar a solubilidade dos APIs vão de 25 a 80°C (298,15 a 333, 15 K) e as pressões até 400 bar (40 MPa) (ABDULLAH, 2007; CHAMPEAU et al., 2015a).

A determinação experimental da solubilidade de uma substância em CO₂ denso pode ser uma tarefa demorada e dispendiosa e por isso, modelos capazes de correlacionar e prever a solubilidade de bioativos em scCO₂ são desejáveis (TABERNERO et al., 2014). As predições são feitas a partir de equações semi-empíricas, equações de estado, modelos de solução ou simulação molecular (TABERNERO et al., 2012).

As equações de estado, como *Soave-Redlich-Kwong* e *Peng-Robinson*, podem ser utilizadas para modelar a solubilidade de bioativos em sc-CO₂ com e sem cossolventes. Entretanto, o emprego dessas equações necessita de métodos computacionais robustos e o conhecimento de várias propriedades como a pressão de sublimação, volume molar, temperatura crítica e pressão e, às vezes também parâmetros moleculares (TABERNERO et al., 2014; PEREIRA, 2015).

Pereira (2015) fez a predição do comportamento termodinâmico do óleo de borage no scCO₂, a partir da equação de *Peng-Robinson*.

As equações semi-empíricas, como o modelo de *Chrastil* (equação 16) utilizado por Gaspar *et al.* (2003) para calcular a solubilidade do óleo de borage em scCO₂, podem ser aplicadas como alternativa às equações de estado para correlacionar e prever a solubilidade do API no scCO₂. Esses modelos correlacionam os dados de solubilidade experimentais com a densidade do solvente supercrítico e a temperatura do sistema binário e, portanto, não requerem propriedades do soluto sólido puro.

$$\ln(C) = k \ln(\rho) + \frac{a}{T} + b \quad (16)$$

Onde:

C = concentração (ou fração molar) do soluto

ρ = densidade do solvente

T = temperatura

k = número de moléculas associadas do solvente com uma molécula do soluto,

a = relação entre calor de solvatação e calor de vaporização do soluto

b depende da massa molecular e pontos de ebulição do solvente e soluto.

No caso do óleo de borage, Gaspar et al. (2003) obtiveram como valores ótimos para os parâmetros: $k = 9,95$; $a = -3984,9$ e $b = -52,8$.

2.4.3.2.3 Interação API - polímero

A interação entre o API e o polímero é o principal critério para garantir o sucesso ou bom rendimento da impregnação. Quando o bioativo interage fracamente ou não interage com matriz polimérica, ele acaba por ficar na superfície da mesma e frequentemente cristaliza. Quando o API tem boa afinidade com o polímero, devido às interações de *van der Waals* ou ligações de hidrogênio, resulta em uma dispersão molecular, maior coeficiente de partição (K) do API em favor do polímero e conseqüentemente um maior carregamento do bioativo no polímero. Estas interações foram investigadas por técnicas espectroscópicas em vários trabalhos realizados por Kazarian et al. (1993, 1998, 2002 e 2003), bem como por outros pesquisadores (BANCHERO et al., 2009; GONG et al., 2006; LÓPEZ-PERIAGO et al., 2009; MANNA et al., 2007).

Estudos demonstraram que a incorporação de APIs em polímeros apresenta melhor rendimento quando o API e o polímero apresentam caráter hidrofílico ou hidrofóbico similar (CHAMPEAU et al., 2015). Um exemplo disso é dado por Dias *et al.* (2013), que impregnaram extrato de jucá em três matrizes poliméricas com melhor eficiência de incorporação para N-carboxi-butil-quitosana, por serem ambos hidrofóbicos.

O processo difusivo influencia na SSI/SSD, pois a transferência de massa depende da solubilidade do API no $scCO_2$ e da difusão do bioativo na matriz polimérica, sendo esta uma etapa limitante do processo de impregnação. A difusão com $scCO_2$ é mais rápida na SSI/SSD do que nos métodos convencionais de impregnação, por conta do

inchamento do polímero e solvatação do API promovidos pelo scCO₂, que difunde melhor na matriz (CHAMPEAU et al., 2015; DUARTE et al., 2009c).

O efeito da pressão está intimamente relacionado ao grau de sorção do CO₂ no polímero, pois o aumento na pressão à temperatura constante, leva ao aumento da sorção e permite um aumento da solubilidade do bioativo no CO₂ (BRAGA et al., 2008; CHAMPEAU et al., 2014; MASMOUDI et al., 2011). Em alguns trabalhos, observa-se a redução da quantidade de API impregnada ao se elevar a pressão, o que pode ser justificado pelas interações entre o CO₂ e o API serem maiores que aquelas entre o API e o polímero (MEDEIROS et al., 2017; SHEN et al., 2008). Densidades mais altas, decorrentes do aumento de pressão à temperatura constante, reduzem a distância intermolecular e podem favorecer as interações específicas entre API e o scCO₂ (COSTA et al., 2010; DUARTE et al., 2009c; YAÑES et al., 2011; YOGANATHAN et al., 2010).

O aumento da temperatura tem um efeito favorável na impregnação/deposição, pois aumenta a solubilidade do API no scCO₂ e devido ao aumento da flexibilidade das cadeias, permite uma melhor difusão da mistura CO₂ + API na matriz (BRANTLEY et al., 2000; CHAMPEAU et al., 2015a; DUARTE et al., 2006a; DUARTE et al., 2009b; KAZARIAN et al., 1998).

Interações fortes entre o polímero e o API, como ligações de hidrogênio, favorecem uma maior impregnação, porém mais lenta, porque diminuem a difusividade do fármaco no polímero. Outro fator que pode interferir na velocidade da impregnação é a espessura do material polimérico: quanto maior é a espessura da amostra, maior o tempo que leva para ocorrer a impregnação (BIERHAULZ, 2014; CHAMPEAU et al., 2015; DUARTE et al., 2009c).

Outros fatores que interferem na impregnação e dependem da interação entre o API e o polímero são: a taxa de despressurização e a velocidade de agitação da mistura scCO₂-API. Geralmente, se o API tem uma fraca afinidade com o polímero, ele pode ser arrastado pelo CO₂ durante a despressurização. Nessa situação, a taxa de despressurização alta favorece o aprisionamento do API no polímero, pois causa colapso nos poros do polímero e impede a saída do bioativo. O oposto disso ocorre quando há alta afinidade do API com o polímero (coeficiente de partição favorável ao polímero). Nesta situação as taxas podem ser mantidas mais baixas (BRAGA et al., 2011). No

entanto, muitas vezes, a escolha da taxa de despressurização se deve ao fato de que uma taxa muito alta danifica a matriz polimérica (CABEZAS et al., 2012; CABEZAS et al., 2013; DIAS et al., 2013; NATU et al., 2008).

- Efeito da velocidade de agitação da mistura CO₂-API

Cabezas et al. (2012, 2013) incorporaram indometacina e 5-fluoroacil em dois polímeros biodegradáveis, PLGA e PLA e, perceberam que, apesar da tensão superficial do scCO₂ ser próxima a zero, o aumento da velocidade da agitação da mistura scCO₂-API favorece a impregnação. Em um dos polímeros (PLA) foi observado que a impregnação não melhora com o aumento da agitação da mistura fluida acima de 500 rpm. No entanto, em particular para o PLGA, esta velocidade de agitação não foi suficiente para aumentar a impregnação e, por isso, eles recomendaram o uso de 1000 rpm para assegurar a correta impregnação e alcançar mais cedo o estado de equilíbrio. Neste caso, o aumento da velocidade de agitação máxima está relacionado com o aumento do tamanho de poros no polímero.

2.4.4 Conclusões

Muitos estudos sobre impregnação/deposição com scCO₂ têm sido realizados nos últimos 20 anos, demonstrando o interesse existente nesse processo. Na tabela 4, encontram-se alguns destes trabalhos escolhidos por utilizarem agentes bioativos de origem natural na área de dispositivos médicos (curativos, endopróteses, *scaffolds*) e de liberação controlada.

Dos estudos citados relacionados com curativos, dois deles apresentaram o mesmo tipo de curativo de celulose e colágeno utilizado no presente trabalho, mas impregnado com bioativos e condições experimentais diferentes, além de não apresentarem ensaios de sorção (DIAS et al., 2013; PASCOAL et al., 2017).

Apenas um trabalho com o poliuretano em forma de filme foi encontrado (ZHANG et al., 2014), mas sem possibilidade de comparação com o poliuretano em forma de espuma, devido à porosidade e espessura do material.

De acordo com dados da literatura (até a atual data), nenhum trabalho com óleo de borage ou extrato de jambu para curativos foi encontrado.

Desta maneira, a presente tese propõe utilização de CO₂ supercrítico para impregnação/deposição de dois tipos de curativos em forma de espuma:

- Poliuretano associado ao óleo de borage – que pode ser utilizado para ferimentos com exsudato, a exemplo de escaras e úlceras, acelerando a cicatrização;
- Colágeno e celulose associado ao extrato de jambu – curativo utilizado para ferimentos mais graves, crônicos e cirúrgicos, bem como queimaduras de segundo grau, que associado ao extrato de jambu pode trazer conforto ao paciente pelo efeito anestésico e analgésico.

Tabela 4 – Exemplos de trabalhos publicados sobre a impregnação/deposição de polímeros utilizando scCO_2 e bioativos de origem natural para aplicações biomédicas nos últimos 20 anos.

(continua)

Material	API	Forma	Condições (K/MPa e rendimento)	Referências
PMMA-PCL	Colesterol	Microesferas	313 K /20 MPa/ 10-20%	ELVIRA et al., 2004
PE de alto peso molecular	α -tocoferol	Endoprótese	403 -443 K/ 10-13 MPa/ 0,4-1%	GAMSE et al., 2007
PCL blends	Timolol	Filme	313 K/ 11-20MPa 12-33 mg/g	NATU et al., 2008
Celulose	Mentol e vanilina	Fibras	293-323 K/5,6-17,6MPa 6% e 14%	SHEN et al., 2008
Silica mesoporosa	vit. E	Partículas	313 K/ 8-5 MPa 0,5-1,1%	BELHADJ- AHMED et al., 2009
Quitosana (CBC) Agarose	Quercetina/Timolol	Dressing	303 – 323 K 10-20 MPa CBC: 0-2,6%/ 0,6-2,5% Agarose: 1,8-2,5%/ 1,6-2,4%	DIAS et al., 2011
Quitosana	Lactulose	Scaffolds Microsfersas	333-373K/ 10MPa Scaffolds: 0,2-8,6% Microsfersas: 2,4-4%	DÍEZ-MUNICIO et al., 2011
P(D,L)LA	Paclitaxel	Filme	313,15K/20MPa 0-0,1%	YODA et al., 2011
Amido de milho pré-gelatinizado	Óleo de linhaça Ácido Oleico	Filme	313,15-353,15K/15-30MPa 0,5-6,6%/ 3-11,4%	COMIN et al., 2012
Amido	Óleo de orégano	Microsfersas	313,15 e 323,15K/ 8- 15MPa/ 0,4-3%	ALMEIDA et al., 2013
Quitosana (CBC)/ Celulose-colágeno/ Ácido hialurônico	Extrato de jucá (<i>Libidibia férrea</i>)	Dressing	323,15K/ 27MPa CBC:46-48%; Cel./Colag.: 28-31% A. Hial.: 25-28%	DIAS et al., 2013
PCL	Extrato do líquen <i>Usnea lethariiformis</i>	Scaffolds	308,15K/15MPa 0,7-2,8%	FANOVICH et al., 2013
Amido de mandioca	Cinamaldeído	Filme	308,15K/15-25MPa	SOUZA et al., 2014
LLDPE	Timol	Filme	313,15K/7-12MPa 3.81%	TORRES et al., 2014

Tabela 4 – Exemplos de trabalhos publicados sobre a impregnação/deposição de polímeros utilizando scCO₂ e bioativos de origem natural para aplicações biomédicas nos últimos 20 anos.

(conclusão)				
Poliuretano	Hidroxycumarina	Filme	313 K/15MPa 0,3%	ZHANG et al., 2014
Amido de milho e mandioca	Timol	Filme	308 K/15 MPa A. Milho: 1,1–4,0% A. Tapioca: 0,6–3,6%	MILOVANOVIC et al., 2015
LLDPE	Eugenol	Filme	318K/ 10-15MPa 1-6,0%	GOÑI et al., 2016
PCL, PCL-HA	Timol	Filme	308 -313 K /10-30MPa 11-23,7%	IVANOVIC et al., 2016
Aerogel de sílica/ alginato	Fitol	Espuma	313 K/ 20 MPa 30,1% e 22,1%	MUSTAPA et al., 2016
Aerogel de Alginato	Vitamina D ₃	Espuma	278 -308 K/8MPa 1%	PANTIC et al., 2016
Poliuretano	Óleo de Borage	Espuma	308-328 K/ 8,9-30 MPa 3-11,8%	SILVA et al., 2016
Gelatina/Colágeno-Celulose	Óleo de Copaíba	Dressing	318 K/13-32 MPa Gelatina: 0,5-2,1% Colág-Celul.:0,5-1,5%	PASCOAL et al., 2017
Colágeno-Celulose	Extrato de Jambu	Dressing	308 K/ 8,9-18,3 MPa 2,4-6,4%	SILVA et al., 2018
LLDPE	Eugenol e óleo de cravo	Filme	298-318 K / 15-25MPa Eugenol: 11-44 mg Ól. cravo: 10-40 mg	MEDEIROS et al., 2017

FONTE: A autora (2018)

Capítulo III

Materiais e Métodos

3.1 MATERIAIS

A relação dos principais materiais utilizados neste trabalho, incluindo reagentes, solventes e matrizes poliméricas, está listada a seguir:

- (i) *Foam Dressing* – curativo em forma de espuma de poliuretano da marca Bastos Viegas – Portugal.
- (ii) *Promogran*[®] - curativo em forma de espuma liofilizada estéril composto por 55% de colágeno bovino e 45% de celulose regenerada oxidada (ORC) gentilmente cedido pela *Systagenix Wound Management* (atualmente, *Acelity Company – USA*)
- (iii) Óleo de borage, contendo 23% (m/m) de ácido γ -linolênico gentilmente doado pela *Bioriginal Food & Science Corp.*, Canadá.
- (iv) Extrato de flores de Jambu (*Spilanthes acmella*) obtido por extração com dióxido de carbono supercrítico (DIAS et al., 2017), em uma etapa anterior a este trabalho.
- (v) Dióxido de carbono (99,5%) obtido da *Praxair* (Portugal)
- (vi) Etanol (99,9%) *Scharlab*, Espanha; Acetato de etila (99,9%) e solventes utilizados para as análises em HPLC, como: acetonitrila (99,9%), 2-propanol (99,8%) e n-hexano (99%), adquiridos da *Carlo Erba Reagentes*, Itália.
- (vii) A água ultrapura (purificada por sistema de osmose reversa *Milli-Q* da Millipore) empregada para a caracterização do material através de medidas de ângulo de contato e permeação de vapor d'água.

3.2 MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada no *Green Sustainable Processes Lab - GSP*, localizado no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade de Coimbra, Portugal.

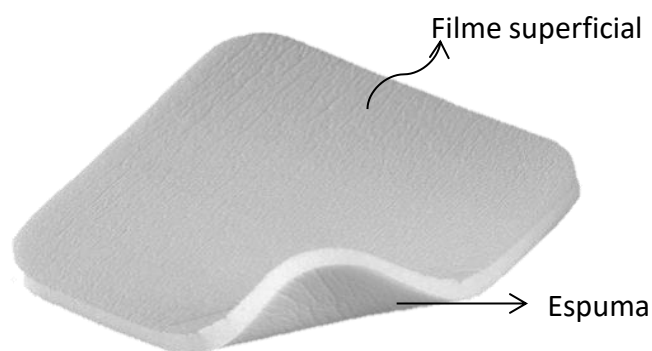
3.2.1 ENSAIOS DE SORÇÃO/DESSORÇÃO

Os testes de sorção/dessorção foram realizados em curativos comerciais: poliuretano (Figura 20), composto por duas camadas distintas: um filme superficial (com

função de proteção do ferimento de contaminantes externos) e uma camada de espuma (com função de absorção dos exsudatos da ferida) e *Promogran*[®] (Figura 21).

Para os experimentos de sorção, removeu-se o filme superficial do curativo de poliuretano com etanol, pois em testes prévios, observou-se que este se desprendia facilmente da espuma após a depressurização rápida.

Figura 21 – Curativo de poliuretano comercial utilizado nos experimentos



FONTE: A autora (2018)

Figura 21 – Curativo de colágeno/celulose (*Promogran*[®]) utilizado nos experimentos



FONTE: A autora (2018)

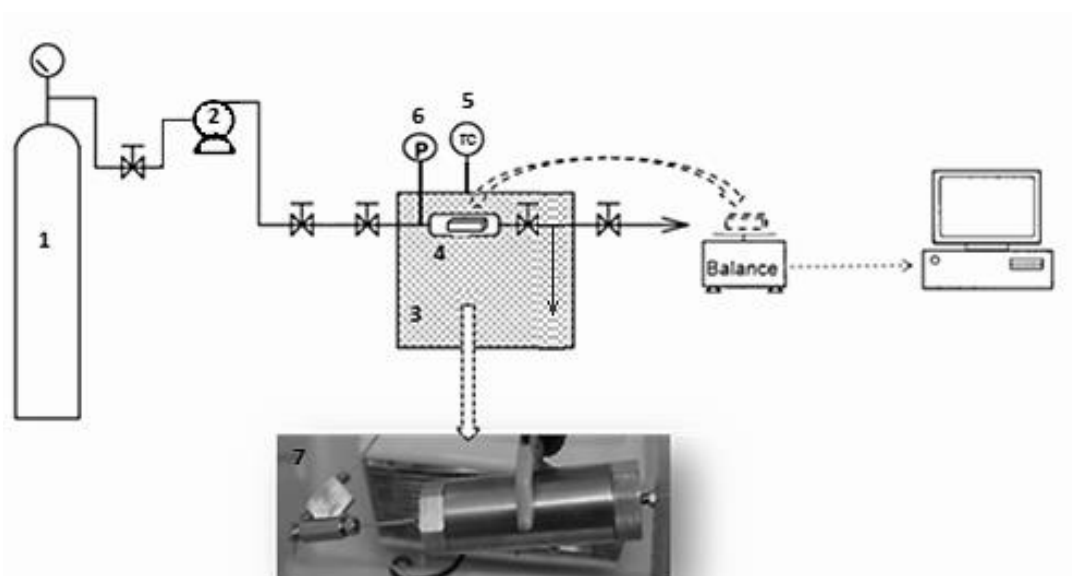
Inicialmente, ambos curativos foram acondicionados em estufa a 313,15 K, por no mínimo, 24 horas, com umidade de 0,7%. Por serem materiais relativamente higroscópicos, os curativos foram mantidos na estufa e pesados até a estabilidade da

massa dos curativos. Em seguida, foram cortados em formato retangular - poliuretano (aproximadamente 1,5 cm (L) × 5,0 cm (P) × 0,4 cm (E)) e *Promogran*[®] (aproximadamente 1,0 cm (L) × 3,0 cm (P) × 0,2 cm (E)), pesados e posicionados em célula de alta pressão de abertura rápida imersa em um banho de ar térmico com temperatura controlada.

As temperaturas, tempos e densidades de scCO₂ utilizados nos experimentos de sorção foram escolhidos a partir da experiência dos trabalhos anteriores do grupo. As pressões referentes às densidades escolhidas foram obtidas através do banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology - USA - NIST*). No entanto, as pressões utilizadas poderiam ser calculadas por meio de equações de estado como a equação de Van der Waals.

O aparato experimental de sorção utilizado nos experimentos encontra-se esquematizado na Figura 22, destacando a foto da célula de alta pressão (Thar, 10 mL de aço inoxidável) com fácil abertura.

Figura 22 - Esquema do sistema de sorção. Onde: 1) Reservatório de CO₂, 2) Bomba de CO₂ de alta pressão, 3) Banho de ar com temperatura controlada 4) célula de sorção de abertura rápida, 5) Controlador e indicador de temperatura, 6) transdutor de pressão, 7) Foto da célula.



FONTE: A autora (2018)

O método gravimétrico foi escolhido para avaliar a sorção do CO₂ supercrítico nos curativos poliméricos. As condições de trabalho (temperatura, densidade do CO₂ e tempos) foram escolhidas, baseando-se em trabalhos prévios do grupo e dados da

literatura. Para cada temperatura de trabalho definida, o sistema foi pressurizado com CO₂ usando uma bomba seringa de alta pressão (Teledyne Isco, modelo 260D) até atingir a pressão e densidade de CO₂ desejadas (tabela 6). Após o período de contato estabelecido entre o polímero e o CO₂ a alta pressão, a célula foi rapidamente aberta (aproximadamente 30 segundos) e a amostra transferida, à temperatura ambiente, para uma balança analítica (Sartorius CPA225D, sensibilidade 0,01 mg) para registro da massa da amostra ao longo do tempo (massa de CO₂ desorvida do curativo x tempo). A massa da amostra foi pesada e gravada a cada 2 segundos por 500 segundos ou até sua estabilização, através do software *RS Key 1.4 (A&D Company, Limited – Japão)*.

Tabela 5 – Condições experimentais para os ensaios de sorção/ desorção

Material	Temperatura (K)	Densidade de scCO ₂ (Kg.m ⁻³) / Pressão (MPa)	Tempo (h)
Poliuretano	308,15	650 / 8,9	1 2 4 8 16
		750 / 11,3	
		850 / 18,3	
	318,15	650 / 11,9	
		750 / 15,5	
		850 / 24,1	
	328,15	650 / 14,9	
		750 / 19,8	
		850 / 30,0	
Promogran®	308,15	650 / 8,9	0,5 2 4 8 16
		750 / 11,3	
		850 / 18,3	
	318,15	650 / 11,9	
		750 / 15,5	
		850 / 24,1	

FONTE: A autora (2018)

A sorção foi calculada a partir da seguinte equação:

$$S (\%) = \frac{M_0}{M_0 + M_i} \times 100 \quad (9),$$

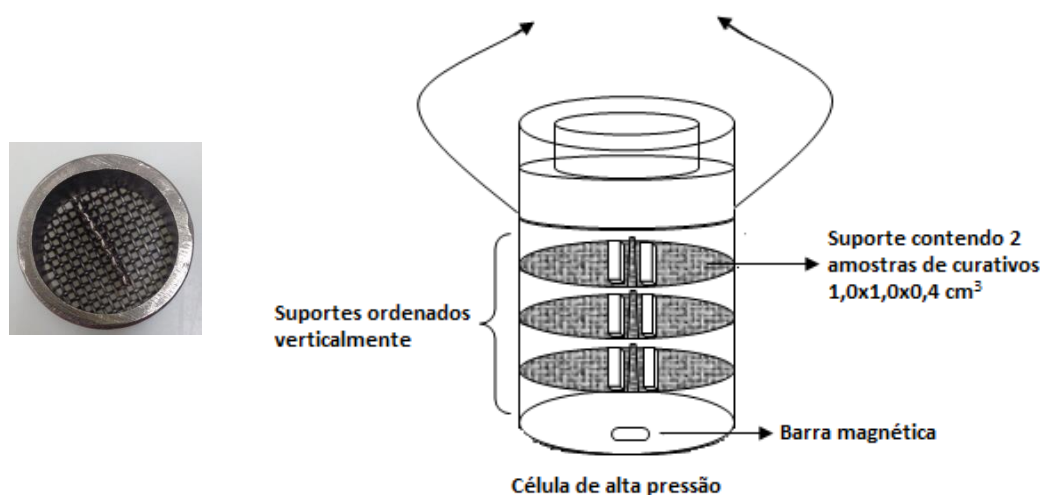
onde M₀ é a massa estimada de CO₂ sorvida pela amostra no equilíbrio e M_i é a massa inicial do polímero. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos, caso apresentassem coeficiente de variação maior do que 15 %.

Os resultados de M₀ e D foram estimados pelas soluções analítica e numérica da Lei de Fick e obtidos por Pereira (2015) em seu trabalho de mestrado.

3.2.2 IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO

Os ensaios de impregnação/deposição foram realizados com os curativos de poliuretano sem o filme superficial, removidos com etanol. Inicialmente, as amostras de polímeros foram cortadas em quadrados de 1,0 cm (L) × 1,0 cm (P) × 0,4 cm (E) para o poliuretano e 1,0 cm (L) × 1,0 cm (P) × 0,2 cm (E) para a *Promogran*[®], previamente pesadas e colocadas em suportes de aço inoxidável ordenados verticalmente (Figura 24). Cada suporte comporta duas amostras de polímero e a célula de alta pressão comportou 3 suportes por experimento.

Figura 23 - Foto do suporte e esquema da célula de alta pressão utilizados no sistema de impregnação/deposição



FONTE: A autora (2018)

O equipamento de impregnação/deposição supercrítico utilizado, nos experimentos, consiste em um compressor de CO₂, uma célula de alta pressão de aço inoxidável mergulhada em um banho de água termostático e uma placa de agitação magnética a 700 rpm. A agitação torna-se importante para dissolver e homogeneizar a mistura (óleo de borage ou extrato de Jambu + scCO₂ ou extrato de Jambu + scCO₂/etanol (95%/5% molar)) a alta pressão. A Figura 24 apresenta o esquema do aparato de impregnação.

Na célula de alta pressão, primeiramente, adicionou-se o óleo de borage ou extrato de Jambu e, depois, os suportes com os curativos.

Para garantir a saturação da fase móvel (scCO₂), acrescentou-se aproximadamente 2,3 vezes mais (320 mg) que a quantidade máxima de óleo (142,8 mg)

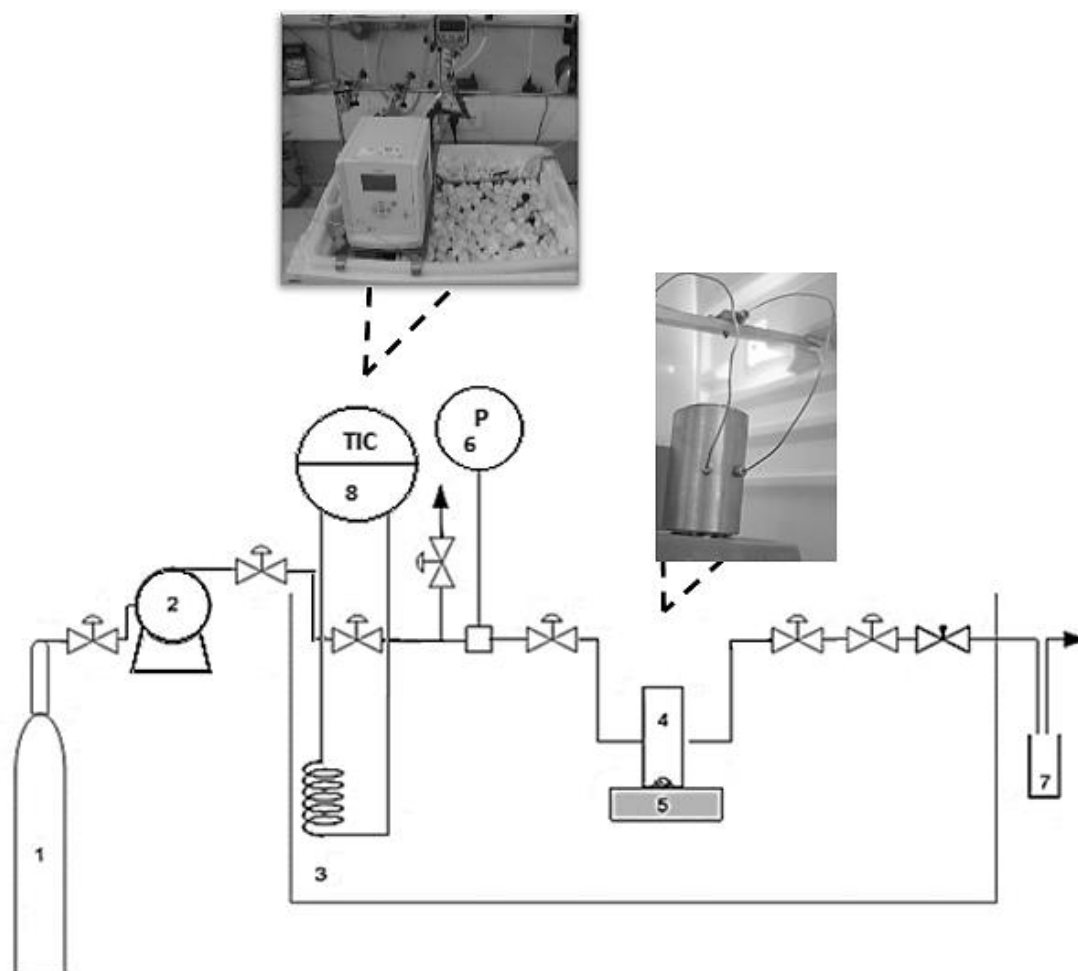
a ser solubilizada na temperatura de 328 K, na pressão de 30,0 MPa e na densidade de CO₂ de 850 Kg.m⁻³ (calculada por dados indiretos de solubilidade obtidos por GASPAR, 2003). A quantidade de óleo colocado na célula foi baseada na solubilidade obtida experimentalmente do óleo de borage em etanol, à temperatura de 308,15 K e agitação de 700 rpm para que fosse possível comparar os dois tipos de incorporação (por supercrítico e por imersão com etanol). No entanto, por conta da mudança de coloração do poliuretano durante o processo de secagem, optou-se por utilizar nos trabalhos somente a impregnação/deposição supercrítica.

Para o ensaio de impregnação/deposição da *Promogran*[®], a quantidade de extrato de Jambu utilizada (100 mg) foi 10 vezes superior ao valor de solubilidade do extrato em CO₂ (10 mg) estabelecida por dados indiretos de solubilidade de sua extração com scCO₂ obtidos por Dias et al. (2017), de modo a garantir que não limitasse incorporação do API. No entanto, foram também testadas quantidades maiores de extrato de jambu na célula de impregnação (300 e 150 mg), mas por conta da agitação, o extrato acabava por respingar nos curativos, promovendo uma impregnação/deposição heterogênea. Por este motivo, foi escolhida a máxima quantidade de extrato (100 mg), onde o processo SSI/SSD ocorreu sem respingos e visualmente homogêneo.

Os experimentos de impregnação/deposição foram conduzidos de acordo com as condições apresentadas na Tabela 7. As temperaturas e densidades foram escolhidas pelos resultados de solubilidade dos agentes bioativos, sensibilidade térmica do material, no caso da *Promogran*[®] (PASCOAL et al., 2017) e, pelos resultados de sorção.

Após este período, o sistema foi cuidadosamente despressurizado à taxa de 1 MPa.min⁻¹ para o poliuretano (taxa de pressurização utilizada pelo grupo em trabalhos anteriores) e 0,5 MPa.min⁻¹ para a *Promogran*[®], já que em testes prévios, este curativo deformava em taxas de despressurização maiores do que a utilizada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 24 - Esquema de equipamento de SSI/SSD. 1) Reservatório de CO₂, 2) Bomba de CO₂ de alta pressão, 3) banho de água termostatazido, 4) célula de impregnação inox de alta pressão, 5) agitador magnético, 6) transdutor de pressão, 7) “trap” de vidro, 8) controlador/indicador de temperatura.



FONTE: A autora (2018)

Tabela 6 – Condições experimentais para os ensaios de impregnação/ deposição

Material/API	Tempo de contato	Temperatura (K)	Solvente	ρ scCO ₂ (Kg.m ⁻³) / Pressão (MPa)	Taxa de Despressurização (MPa.min ⁻¹)
Poliuretano/ Óleo de Borage (320 mg)	3h	308,15	ScCO ₂ ScCO ₂	650 / 8,9 850 / 18,3	1
		328,15	ScCO ₂	850 / 30,0	1
Promogran® / Extrato de Jambu (100 mg)	4h	308,15	ScCO ₂	650 / 8,9	0,5
			ScCO ₂	750 / 11,3	
			ScCO ₂	850 / 18,3	
			ScCO ₂ + EtOH	850 / 18,3	

FONTE: A autora (2018)

3.2.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO DE BORAGE E EXTRATO DE JAMBU IMPREGNADOS NOS CURATIVOS

A quantificação do óleo impregnado e do extrato de jambu foi realizada nos curativos localizados no suporte intermediário da célula de impregnação. Os curativos do suporte inferior não foram escolhidos, devido à possibilidade de respingar óleo ou extrato durante a homogeneização na amostra, ocasionando quantidades impregnadas maiores que o esperado. Os curativos do suporte superior foram descartados por apresentar quantidade insuficiente de material impregnado.

O método de quantificação escolhido foi o gravimétrico. Em frascos previamente pesados, adicionaram-se as amostras impregnadas em 15 mL de *n*-hexano sob agitação à temperatura de 305,15 K. O solvente foi cuidadosamente removido e repostado novamente em 24 horas. Tal procedimento (secagem e reposição) foi repetido mais uma vez e após a terceira etapa de secagem, o curativo foi removido e o frasco, após evaporação do solvente, foi pesado.

O resíduo seco do óleo de borage contido no frasco foi solubilizado em 5 mL de *n*-hexano e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), usando um equipamento (modelo *LC20AD Prominence, Japão*) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e UV (Modelo SPD-M20A) e uma coluna cromatográfica RP-100-5C18 (250 mm × 4 mm i.d., 5 mm). As condições de programação foram baseadas na literatura (LÍSA e HOLCAPEK, 2008): fluxo da fase móvel de 1mL/min, volume de injeção de 10uL, temperatura de coluna de 298 K com o gradiente de fase móvel: 0 min - 100% acetonitrila, 0-70 min - 45% acetonitrila e 55% 2-propanol; 70–76 min - 100% acetonitrila, mantido constante por 10 minutos para posterior avaliação qualitativa do óleo impregnado nos curativos a partir do seu principal marcador: o ácido γ -linolênico. O extrato de Jambu foi dissolvido em 5 mL de acetato de etila e analisado por Cromatografia Gasosa (*Agilent Technologies, EUA*, modelo GC 7890A), com detector por ionização de chama (CG-FID) e acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) (G3171A MSD), utilizando o espilantol como marcador. A coluna capilar de sílica foi de 30 m × 0,32 mm i.d.; df, 0,25 μ m, 100% de dimetilpolisiloxano (*HP-1 ms, Agilent-J&W Scientific*). O programa de temperatura foi o seguinte: 353 K por 5 min, aumentando até 553 K (a 4 K min⁻¹) e manteve-se durante 10 min a esta temperatura. O hélio foi utilizado

como gás transportador (1,0 ml min⁻¹). A linha de transferência, quadrupolo e fonte de íons foram mantidas em 513, 423 e 503 K, respectivamente.

3.2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CURATIVOS IMPREGNADOS E NÃO-IMPREGNADOS

Os curativos (antes e depois da sorção/dessorção e impregnação/deposição) foram caracterizados por:

- *Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR)* – Para confirmar a impregnação do polímero com o bioativo, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro JASCO 4200 FTIR, operando no modo ATR (MKII Golden Gate™ Single Reflexion ATR System) na faixa de 550 - 4000 cm⁻¹. Cada espectro foi obtido com resolução de 4 cm⁻¹ através de 128 varreduras. Esta técnica foi utilizada para confirmar a deposição supercrítica a partir das comparações de amostras de polímeros impregnadas, não impregnadas e APIs.

- *Picnometria de Hélio* - A densidade absoluta dos curativos foi medida através de picnometria de hélio (*Accupyc 1330 Micromeritics, Micromeritics Instrument Corporation, USA*) usando amostras 1 cm × 1 cm num volume total de cerca de 1 cm³ e a porosidade determinada pela equação 17:

$$P = 1 - \frac{\rho_{\text{aparente}}}{\rho_{\text{absoluta}}} \quad (17)$$

Onde:

densidade aparente = razão entre massa e volume da amostra (Kg.m⁻³)

densidade absoluta = medida pelo picnômetro.

- *Ângulo de contato de água* – a medida de ângulo de contato da água é utilizada para verificar a hidrofobicidade das amostras e foram feitas no equipamento OCA20 da marca *Dataphysics*.

- *Taxa de transmissão de vapor d'água (WVTR) e permeabilidade de vapor d'água (WVP)* – As taxas de transmissão de vapor d'água e permeabilidade de vapor d'água são obtidas com o intuito de verificar a perda de umidade do curativo, isto é útil, uma vez que é desejável que o curativo mantenha um ambiente úmido para acelerar a cicatrização e evitar necrose no tecido do ferimento. Estes valores de WVTR foram determinados com base na norma ASTM E96-90D (2010), monitorando-se a perda da

massa de água das amostras durante um período de tempo (30 horas) através de uma área de transmissão de vapor de 0,636 cm².

O cálculo do WVP foi realizado através da equação 18:

$$WVP = WVTR \frac{1}{P_0(RH_{in} - RH_{out})} \quad (18)$$

Onde:

P_0 = pressão de vapor

RH_{in} = umidade relativa do ar dentro da célula de permeabilidade

RH_{out} = umidade relativa do ar no dessecador (umidade em 20%, utilizando solução saturada de cloreto de lítio).

O WVTR é calculado pela equação 19:

$$WVTR = \frac{M_{\text{água perdida}}}{t.A} \quad (19)$$

Onde:

M = massa de vapor d'água que permeou a amostra no tempo t

A = área da amostra exposta ao ambiente

A morfologia da superfície das amostras de *Promogran*[®] foi analisada por *Microscopia Eletrônica de varredura (SEM)* usando um microscópio *JEOL (modelo JSM-6610LV, Japão)* em 10 kV e diferentes magnitudes. As amostras foram cobertas com ouro (300 Å) usando o *Denton Vacuum (modelo Desk V, USA)*.

Adicionalmente, as amostras de poliuretano foram caracterizadas pelas técnicas a seguir. Estas técnicas não foram repetidas para o *Promogran*[®], porque foram realizadas em um trabalho anterior do grupo (Pascoal et al., 2017):

- *Adsorção de Nitrogênio* – o diâmetro médio e volume dos poros, bem como área de superfície das amostras foram determinadas por adsorção de nitrogênio (*Micromeritics*, modelo ASAP 2000, 20Q-34001-01). A área de superfície foi determinada pelo método de *Brunauer-Emmett-Teller (BET)*, enquanto o volume e o diâmetro médio dos poros foram calculados usando o método de *Barrett-Joyner-Halenda (BJH)*.
- *Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TGA)* – os eventos térmicos foram determinados pelo calorímetro (TA

Instruments, modelo Q200, USA) calibrado com índio, sob atmosfera de nitrogênio em modo dinâmico (50 mL min^{-1}) de 193 K até 473 K com taxa de aquecimento de 10 K min^{-1} . O perfil termogravimétrico das amostras foi obtido por Análise Térmica Diferencial Simultânea (SDT) (*TA Instruments*, modelo Q600, USA) calibrado com índio com temperaturas entre 298 K e 873 K e taxa de aquecimento de 10 K min^{-1} sob atmosfera de nitrogênio (100 mL min^{-1}).

Capítulo IV

Resultados e Discussão

4.1 Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta uma compilação dos resultados experimentais sob a forma de dois artigos publicados no “*Journal of Supercritical Fluids*”, na ordem em que foram realizados. O uso dos artigos neste documento foi autorizado pela Elsevier, conforme documentos anexos.

O primeiro artigo tratou do estudo da sorção de CO₂ em curativos de poliuretano e a modelagem dos resultados utilizando as soluções analítica e numérica da Lei de Fick. A seguir, baseando-se nestes resultados, os curativos de poliuretano foram impregnados com o óleo de borage, uma agente bioativo utilizado para limpeza e cicatrização de ferimentos. Foram avaliados quanto ao rendimento da impregnação e caracterizados curativos impregnados utilizando várias técnicas.

O segundo artigo apresentou os resultados obtidos no estudo de sorção de CO₂ em curativos de colágeno e celulose e a modelagem apenas com a solução analítica da Lei de Fick, já que por experiência do artigo anterior, a solução analítica apresentou resultados com uma faixa de erros aceitável. Baseando-se nos resultados de sorção de CO₂ na matriz polimérica, procedeu-se a impregnação supercrítica dos curativos com extrato de jambu e utilizou-se também etanol como co-solvente. Avaliou-se o rendimento do processo, caracterizando-os.



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu

Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing

C.V. da Silva^a, V.J. Pereira^a, P.T.V. Rosa^b, E.C.M. Cabral-Albuquerque^a,
S.A.B. Vieira de Melo^a, G.M.N. Costa^a, A.M.A. Dias^{c,*}, H.C. de Sousa^c, M.E.M. Braga^{c,*}

^a Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Rua Aristides Novis, 2, 6º andar, Federação, 40210-630, Salvador, Bahia, Brazil

^b Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

^c CIEPQPF, Department of Chemical Engineering, FCTUC, University of Coimbra, Rua Sílvio Lima, Pólo II–Pinhal de Marrocos, 3030-790 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2016

Received in revised form 11 April 2016

Accepted 12 April 2016

Keywords:

scCO₂ sorptionscCO₂ impregnation/deposition

Borage oil

Polyurethane

Mass transfer

ABSTRACT

In this work, experimental equilibrium solubility data of scCO₂ in polyurethane (PUR) foam (scCO₂ sorption capacity) was measured by a gravimetric method for different isotherms (308, 318 and 328 K), scCO₂ densities (650, 750 and 850 kg m⁻³) and scCO₂ exposure times (0.5, 2, 4, 8 and 16 h). Sorption data and CO₂ desorption coefficients were estimated from desorption curves that were modeled using both numerical and analytical solution of Fick's second law, with deviations below 10% in both cases. The influence of scCO₂ sorption capacity on the amount of borage oil impregnated/deposited into the PUR foamed matrix was studied for selected pressure and temperature conditions and based on scCO₂ sorption data. Results showed that the highest solubility of scCO₂ in PUR (~70%) was achieved at the lowest temperature and highest solvent density studied (308 K and 850 kg m⁻³) while the highest borage oil loaded yield was observed at the highest temperature and solvent density studied (328 K and 850 kg m⁻³), meaning that the impregnation/deposition process is controlled by the solubility of borage oil in scCO₂. All the compounds present in borage oil (and which are detected by HPLC) were successfully loaded into the PUR matrix which confirms the feasibility of the impregnation/deposition process. Moreover, the amount of loaded oil did not significantly affect the neat properties of the PUR matrix (mainly its hydrophobicity, thermal resistance and water vapor permeation capacity).

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Wound dressings are used to assist in tissues repair and regeneration throughout the wound healing process. Several polymers can be employed to produce wound dressings and they can be both natural-based, such as polysaccharides and proteins, or synthetic-based, such as poly(urethanes), poly(ethylenes) and poly(acrylonitrile) [1]. Among these materials, poly(urethanes) have been extensively studied for the development of biomedical devices or drug delivery systems, including wound healing applications, due to their excellent physical and mechanical properties and good biocompatibility [2]. Moreover polyurethane is also highly versatile, since it is possible to provide polyurethane-based

materials with widely different properties (such as mechanical strength, flexibility, morphology and biodegradability) by changing the type and proportion of its isocyanate and polyol forming units [3]. In addition, polyurethane may be easily cross-linked, blended with other synthetic and/or natural-based polymers, and processed in the form of particles, fibers, films, foams and hydrogels [4]. All of these advantages justify the large number of commercial polyurethane-based wound dressings available as films (e.g. Opsite® from Smith and Nephew; Bioocclusive® from Johnson & Johnson; Tegaderm® from 3M Health-care) and as foams (e.g. Lyofoam® and DuoDERM® CGF® both from ConvaTec; Allevyn® from Smith and Nephew) [4–6]. Polyurethane dressings have been also successfully impregnated with several drugs, with different bioactivities, such as analgesics (e.g. Biatain® Ibu Foam Dressing impregnated with ibuprofen), cicatrizing agents (e.g. Meliplex® Ag, Allevyn® and Silverlon® impregnated with silver), antibiotics (e.g. vancomycin, gentamycin, ciprofloxacin and rifampicin) [7–10] and anti-carcinogenics (e.g. paclitaxel) [11,12].

* Corresponding author.

E-mail addresses: adidas@eq.uc.pt (A.M.A. Dias), marabraga@eq.uc.pt (M.E.M. Braga).

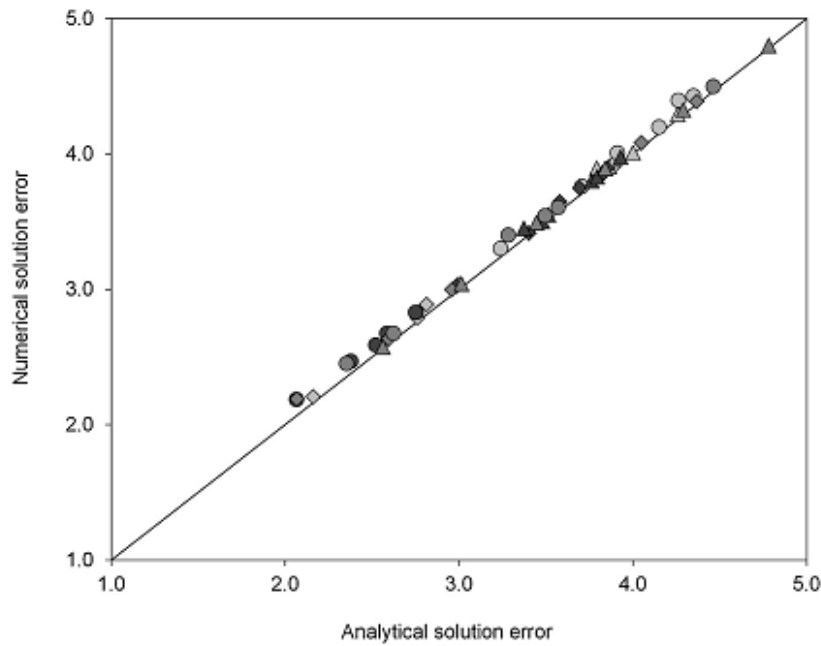


Fig. 1. Comparison of the relative error percentage obtained for the analytical and numerical solutions of Eq. (5) for each isotherm: T=308 K (dark grey); T=318 K (grey); T=328 K (light grey) and different densities: (◊) 650 kg m⁻³, (Δ) 750 kg m⁻³, (○) 850 kg m⁻³.

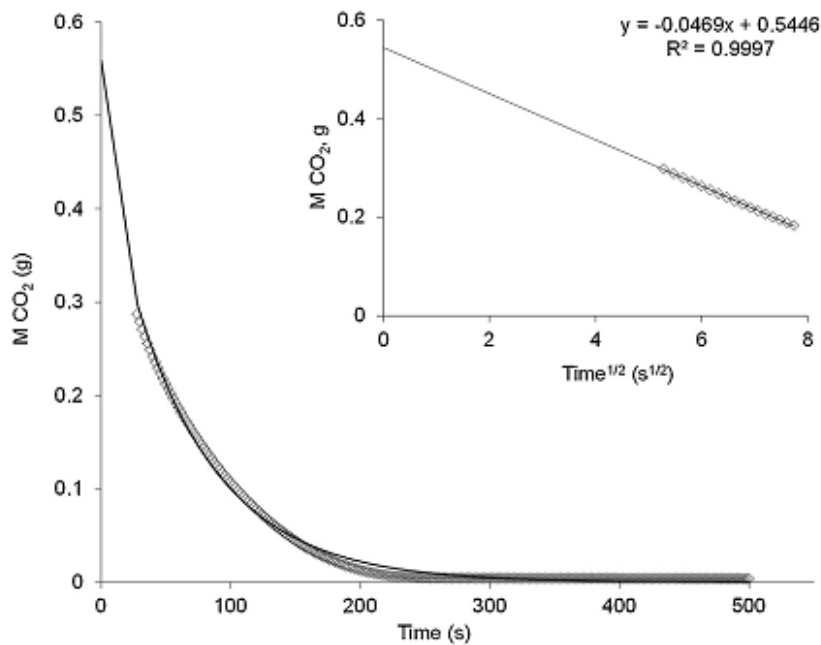


Fig. 2. Desorption curve of carbon dioxide from PUR after an exposure time of 0.5 h at 308 K and scCO₂ density of 650 kg m⁻³ (89 MPa). Symbols represent the experimental points and the line represents modeling results obtained for the analytical solution of Eq. (5).

Different methods can be used to incorporate bioactive substances into polymeric wound dressings, namely by physical mixture (drug + polymer) followed by polymer melting; drug incorporation during polymerization reactions; dissolution/dispersion and soaking of the polymer matrices in drug solutions followed by solvent removal. However, these methods involve the use of high temperatures which may degrade thermally labile substances; the use of organic solvents that may present safety issues and/or can be difficult to remove; the possibility of undesirable reactions with degradation of substances and/or formation of hazardous compounds. Moreover, these processes are time consuming and may

present low efficiency and heterogeneous impregnation due to solvent/drug diffusivity constrains, low matrix swelling capacity to swell and/or weak drug-matrix interactions [13].

Over the last years, supercritical fluid processes, particular those that involve the use of supercritical carbon dioxide (scCO₂), have emerged as efficient alternatives to conventional drug/bioactive impregnation methods. The main advantages have been previously discussed in the literature and are mainly related to the greener character of these techniques, which originate solvent free final materials, and to its versatility, because it is possible to tune the

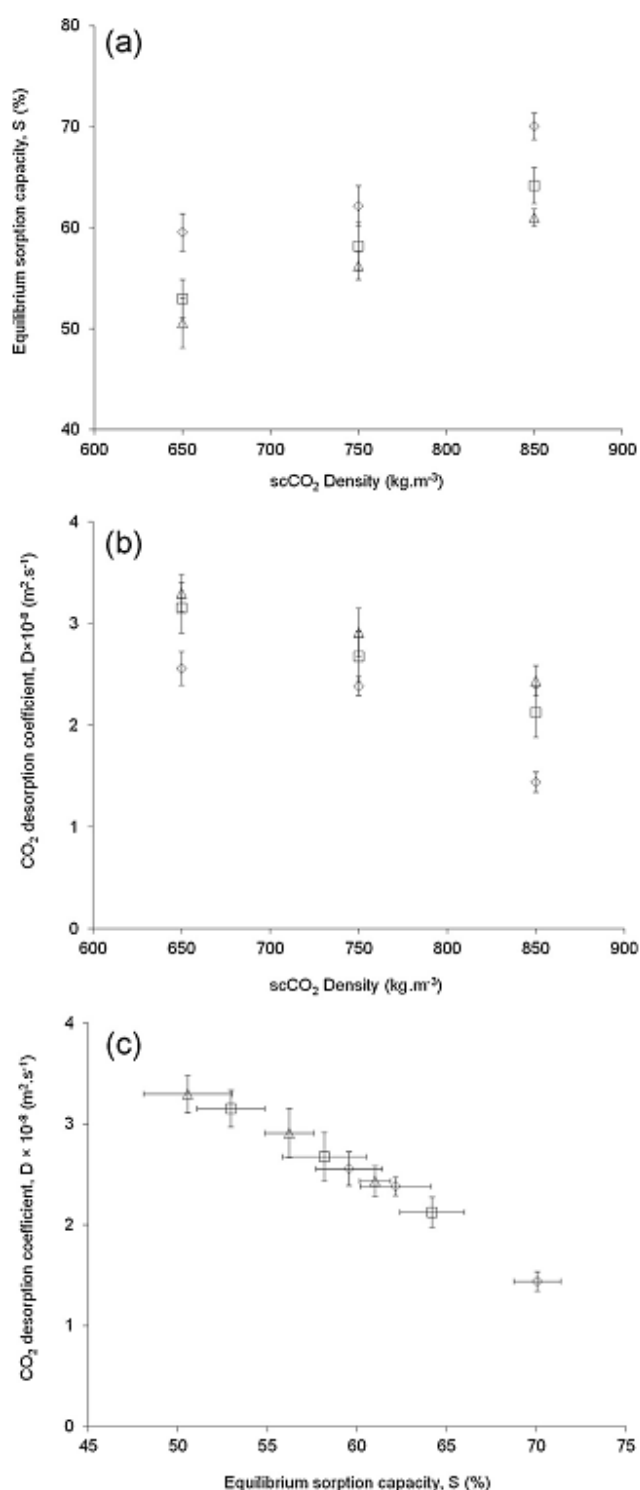


Fig. 3. Effect of scCO₂ density and temperature on the equilibrium sorption of scCO₂ in PUR samples (a) and on CO₂ desorption coefficient (b) and correlation between both properties (c). Symbols represent the isotherms: 308 K (◇), 318 K (□) and 328 K (△).

properties of the solvent by changing process conditions avoiding drug/bioactive degradation [14–20].

The gas-like behavior of scCO₂ favors its diffusion through the polymer structure and the swelling of the matrix, promoting the diffusion of substances within it, with clear advantages in drug homogeneous dispersion and total loaded amount [15,21–24].

The efficiency of supercritical fluid impregnation/deposition depends on the interactions that are established in the ternary system polymer-bioactive-scCO₂ namely the solubility of the drug/bioactive compound in scCO₂, the partition coefficient between the drug and the polymer and the scCO₂ sorption capacity of the polymer [25,26]. The later mostly depends on the physical-chemical properties of the polymer matrix (such as the chemical functional groups in the polymer chain with high affinity for CO₂) and on its chemical structure (crosslinking degree, porosity, surface area, etc.) [17,23,27–30]. Therefore, the optimization of supercritical fluid impregnation/deposition processes requires the knowledge of the solubility and diffusion coefficients of scCO₂ in the polymer matrix to be impregnated.

There are different apparatus/methods that can be used to measure the scCO₂ sorption capacity in polymers, including gravimetric, barometric and spectroscopic methods [23,31–36]. In this work, the equilibrium solubility of scCO₂ in a polyurethane-based polymer matrix (scCO₂ sorption capacity at equilibrium) was measured at different isotherms (308, 318 and 328 K) and scCO₂ densities (650, 750 and 850 kg m⁻³), using a gravimetric procedure. Although less accurate than other methods, its simplicity permits to easily determine high pressure scCO₂-polymer equilibrium data with reasonable accuracy for comparison purposes. The obtained experimental data was used to infer the most favorable experimental conditions that would maximize the scCO₂ impregnation/deposition of borage oil in the polyurethane-based material aiming to prepare wound dressings with enhanced healing properties. Borage oil (*Borago officinalis*) was used in this work because it is rich in essential fatty acids, and particularly in γ -linolenic acid, a precursor to a variety of prostaglandins and leukotrienes, with already proved efficiency in wound healing management [37–40].

2. Materials and methods

2.1. Materials

The commercial polyurethane-based wound dressing (Foam Dressing) was acquired from Bastos Viegas, Portugal. The exact composition of the polyurethane (PUR) sample is unknown due to proprietary reasons. Borage oil with 23% of gamma linolenic acid (GLA) was kindly supplied by Bioriginal Food & Science Corp., Canada. Carbon dioxide (99.5%) was obtained from Praxair and ethanol (99.9%) from Scharlab, Spain. The solvents used for HPLC analysis namely *n*-hexane (99%), acetonitrile (99.9%) and 2-propanol (99.8%) were acquired from Carlo Erba Reagents Italy. MilliQ water, purified by reverse osmosis (Milli-Q water, Millipore) was employed for contact angle and water vapor permeation measurements.

2.2. Pre-treatment of samples

The commercial PUR wound dressing is composed by two distinct layers, a PUR foam layer to absorb wound fluids and a PUR superficial very thin film to protect the wound bed from external microbial contamination according to manufacturer information. In this work, the superficial thin film was separated from the foamed layer with ethanol in order to study the scCO₂ sorption capacity of the foamed layer only. PUR samples were cut into rectangular (~1.5 × 5.0 × 0.40 cm) and square (~1.0 × 1.0 × 0.40 cm) pieces for the scCO₂ sorption and scCO₂ impregnation/deposition measurements, respectively. Before the experiments, samples were dried in an oven at 313.15 K for at least 24 h. The water amount that remains in the samples after drying was ~0.7% (confirmed by thermogravimetric analysis, SDT-TA Instruments).

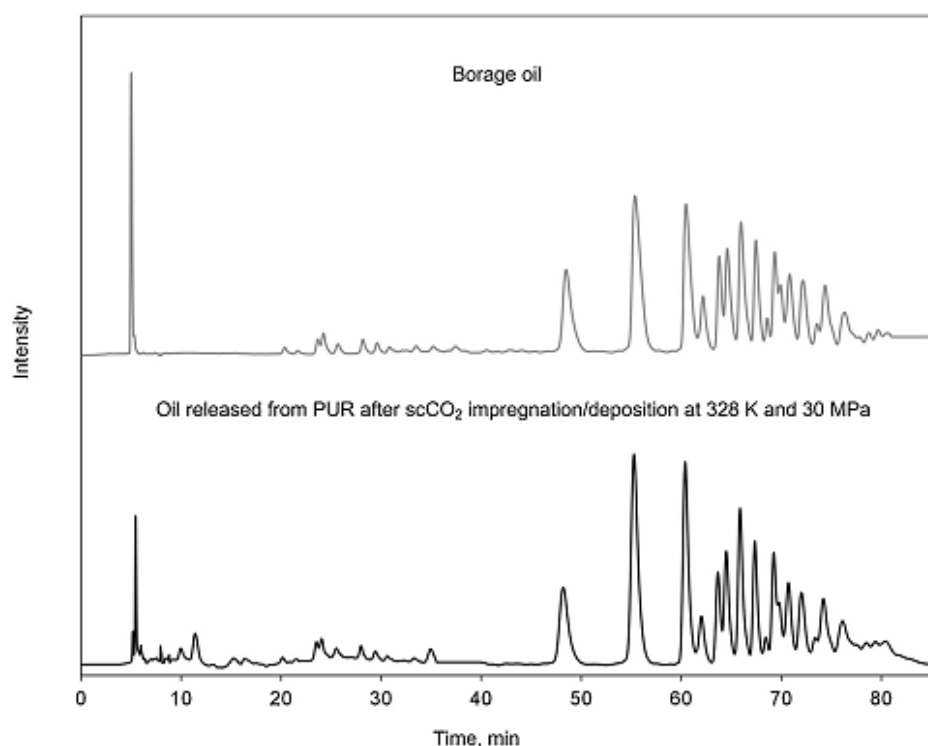


Fig. 4. HPLC chromatographic profiles of pure borage oil and oil released from the PUR sample after scCO_2 impregnation/deposition at 328 K and 30 MPa (850 kg m^{-3}).

2.3. scCO_2 desorption measurements

A gravimetric procedure was used to measure the solubility of scCO_2 in PUR samples according to a methodology previously described in the literature [36] using an equipment represented in Fig. S1. scCO_2 was pumped using a syringe liquid pump (Teledyne Isco 260D) and a quick opening stainless steel high pressure cell (10 ml, from Thar) was used to minimize the time gap between the depressurization onset and scCO_2 desorption data acquisition. Dried PUR samples were loaded into the cell, which was placed inside a thermostated air bath able to control the temperature to within $\pm 1 \text{ K}$. At each previously defined equilibrium temperature (308, 318 and 328 K) the system was pressurized to achieve three different scCO_2 densities: 650 kg m^{-3} , 750 kg m^{-3} and 850 kg m^{-3} . Different scCO_2 exposure times were also tested (0.5, 2, 4, 8 and 16 h). The pressure inside the cell was measured with a pressure transducer to within $\pm 50 \text{ kPa}$. After each established contact time, the cell was quickly depressurized and the sample transferred to a digital balance (Sartorius CPA225D, sensitivity 0.01 mg) at room temperature, which recorded PUR sample weight changes during CO_2 desorption at atmospheric pressure. The time gap between depressurization and the first weight recorded data was $\sim 30 \text{ s}$, in average. The PUR weight was recorded using the RS Key 1.4 software (A&D Company, Limited—Japan) at time intervals of (2 s) and until stabilization ($\sim 500 \text{ s}$). The equilibrium scCO_2 sorption capacity, at each experimental condition, was calculated according to Eq. (1):

$$S(\%) = \frac{M_0}{M_0 + M_i} \times 100 \quad (1)$$

In this equation, M_0 is the mass of scCO_2 absorbed by the sample at equilibrium and M_i is the initial mass of the PUR sample. All experiments were duplicated.

2.4. scCO_2 impregnation/deposition of borage oil in PUR samples

The employed supercritical impregnation/deposition apparatus was already described in the literature [24–26,41]. Briefly it consists in a compressed air-operated CO_2 liquid pump, a high-pressure stainless steel impregnation/deposition cell, a thermostatic controlled water bath, and a magnetic stirring plate to dissolve and homogenize the borage oil and scCO_2 mixture. Samples were vertically fitted into stainless steel supports and placed into the high-pressure cell that already contained a known amount of borage oil (about 2.3 times higher than its equilibrium solubility at the highest temperature and density conditions tested) and taking into account solubility data of borage oil in scCO_2 previously reported in the literature [42]. The scCO_2 impregnation/deposition experiments were carried out at predefined solvent densities of 650 kg m^{-3} (308 K and 9 MPa) and 850 kg m^{-3} (328 K and 30 MPa) and for 3 h based on scCO_2 sorption in PUR data. The system was depressurized at 10 bar min^{-1} . The total amount of borage oil loaded into the PUR samples was quantified by leaching the loaded samples into *n*-hexane (renewed three times in 72 h) with stirring (100 rpm) at 310 K. The solvent was then collected and left to evaporate at room conditions and the amount of oil released from the PUR sample was quantified gravimetrically.

The oil released from the PUR samples was analyzed by HPLC. The chromatographic analyses were performed using a Shimadzu high-performance liquid chromatograph with automatic injection (Model LC20AD Prominence, Japan) equipped with a diode array UV detector (Model SPD-M20A) and a chromatographic column RP-100-5C18 (250 mm \times 4 mm i.d., 5 mm). The program conditions were based on previously reported literature [43]: flow rate of 1 ml min^{-1} , injection volume of $10 \mu\text{l}$, column temperature of 298 K and the following mobile phase gradient: 0 min: 100% acetonitrile; 0–70 min: 45% acetonitrile and 55% 2-propanol; 70–76 min: 100% acetonitrile kept constant for 10 min). The borage oil sample

was dissolved in *n*-hexane and the UV detection was performed at 205 nm.

2.5. Physicochemical characterization of non-loaded and borage oil loaded PUR samples

2.5.1. Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy (FTIR-ATR)

PUR samples were analyzed by FTIR-ATR spectroscopy at 128 scans with 4 cm⁻¹ resolution, between 550 and 4000 cm⁻¹ using a Golden Gate Single Reflection Diamond ATR accessory (Jasco, model 4200, UK).

2.5.2. Nitrogen adsorption and helium pycnometry

The average pore diameter, pore volume and surface area of non-processed and loaded PUR samples were determined by nitrogen adsorption (Micromeritics, model ASAP 2000, 20Q-34001-01). Surface area was determined by the Brunauer-Emmett-Teller method (BET) while pore volumes and average pore diameters were calculated using the Barrett-Joyner-Halenda method (BJH). PUR real density was measured by helium pycnometry (Accupyc 1330 Micromeritics, Micromeritics Instrument Corporation, USA). The porosity of PUR samples was determined by the following equation:

$$P = 1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{solid}}} \quad (2)$$

In this equation ρ_{apparent} (kg m⁻³) is the apparent density (ratio between the weight and the volume of the sample) and ρ_{solid} (kg m⁻³) is the true density measured by helium pycnometry.

2.5.3. Thermal analysis

Thermal events were determined by differential scanning calorimetry (TA Instruments, model Q200, USA) calibrated with indium. Oil loaded and non-loaded samples were placed in aluminum pans and submitted to a temperature program, under nitrogen atmosphere in dynamic mode (50 ml min⁻¹) from 193 K up to 473 K at 10 K min⁻¹. The glass transition temperature (T_g) was calculated as the middle point between the onset and end temperatures caused by the discontinuity of sample specific heat. Thermogravimetric profiles were obtained by Simultaneous Differential Thermal Analysis (SDT) (TA Instruments, model Q600, USA) calibrated with indium and using standard alumina pans. Samples were analyzed between 298 K and 873 K at a heating rate of 10 K min⁻¹ under nitrogen atmosphere (100 ml min⁻¹).

2.5.4. Water vapor transmission rate (WVTR)

Water vapor transmission rate measurements were determined based on the ASTM E96-90D standard [44] and following a procedure previously described in the literature [25,41]. Permeability cells were filled with 2 g of Milli-Q water and PUR samples were fixed on the top of the cells with an exposed vapor transmission area of 0.636 cm². Cells were weighed and placed inside desiccators at 305 K and 20% RH (atmosphere created with a saturated lithium chloride solution). The slope of the water loss vs time, normalized by the vapor transmission area (A), was used to calculate the water vapor transmission rate, according to Eq. (3):

$$\text{WVTR} = \frac{\text{water mass lost}}{tA} \quad (3)$$

The water vapor permeability was then calculated as follows:

$$\text{WVP} = \text{WVTR} \frac{l}{P_0(RH_{\text{in}} - RH_{\text{out}})} \quad (4)$$

In this equation l is the PUR sample thickness, P_0 is the water vapor pressure at 305 K, and RH_{in} and RH_{out} are the relative humidity of the air inside the permeability cell (assumed to be equal to 100%)

and in the desiccator (20%), respectively. Measurements were performed in duplicate.

2.5.5. Water contact angle

Water contact angle measurements were performed using the sessile drop method and an OCA20 contact angle apparatus (Data-physics Instruments GmbH, Germany). An average of 5 drops was analyzed in each sample.

3. Data analysis

The model used to fit the desorption kinetic experimental data for the scCO₂-PUR system is based on mass transfer equations, considering that diffusion occurs in an isotropic medium, i.e., the polymer structure and the scCO₂ diffusion properties are equal in all directions. Fick's 2nd law (Eq. (5)) is a simplified mass transfer differential equation which applies to rectangular geometries and unidirectional flow.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (5)$$

where (C) is the concentration of the substance that diffuses, (t) is time, (x) is the spatial coordinate perpendicular to the flow section and (D) is the diffusion coefficient.

This equation is valid when the sample's thickness is much smaller than other dimensions, which is an acceptable assumption for PUR samples. It is important to note that in Eq. (5), the diffusion coefficient is assumed to be constant, since the medium is considered isotropic. A more rigorous analysis of the diffusion phenomenon should take into account the diffusion coefficient dependency on the tortuosity of the polymer structure and the concentration of the solute that diffuses.

Eq. (5) can be solved by numerical or analytical methodologies, the later assuming that it can be solved by variable separation method according to:

$$C(x, t) = X(x) \times T(t) \quad (6)$$

where (X) and (T) are functions of (x) and (t), respectively.

Although the analytical solution of the Fick's 2nd law is known for a rectangular geometry, it is not trivial for other more complex geometries. In those cases the numerical solution of Eq. (5) is an alternative. In this work, both approaches were used for comparison purposes considering the following initial and boundary conditions: ($C = C_0$; $0 < x < L$; $t = 0$) and ($C = 0$; $x = 0$, $x = L$; $t > 0$), respectively where C_0 is the initial concentration of scCO₂ in PUR and L is the thickness of the PUR sample.

The analytical solution of the Fick's 2nd law, expressed in terms of mass of CO₂ present in the PUR sample during desorption, is given by Eq. (7), as follows:

$$M(t) = \frac{8M_0}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[- \left(\frac{(2n+1)\pi}{l} \right)^2 Dt \right] \quad (7)$$

where (M_0) is the initial mass of CO₂ present in the PUR sample, ($M(t)$) is the mass of CO₂ at time (t) and (D) is the diffusion coefficient. The estimates for (M_0) and (D) were obtained from Eq. (7), truncated on the second term. This approach can be made since the short term region of the desorption curve is approximately linear.

The method of finite differences was used to estimate (M_0) and (D) through the numerical solution of Eq. (5). In both cases (analytical and numerical solution), the simplex Nelder-Mead algorithm [38] was used to search the optimal value of the objective function using a routine in Matlab (R2012). This method minimizes the objective function without the need to report any derivative

(implicit or explicit). The minimized objective function (F_{obj}) is given by Eq. (8):

$$F_{obj} = \frac{\sum (m_{exp} - m_{cal})^2}{\sum m_{exp}^2} \quad (8)$$

where m_{exp} and m_{cal} represent the mass of CO_2 measured and calculated, respectively.

4. Results and discussion

As previously described in the data analysis section, the equilibrium amount of $scCO_2$ adsorbed by the PUR sample (M_0) and the desorption diffusion coefficients (D) were estimated by fitting the experimental $scCO_2$ desorption curves, using both analytical and numerical methodologies to solve the simplified Fick's 2nd law equation (Eq. (5)). As can be seen in Fig. 1 both methodologies were capable to correctly fit experimental data with low and similar relative error percentages. Therefore only the results given by the analytical solution of Eq. (5) will be discussed in what follows. An example of an experimental CO_2 desorption curve (measured after exposing the PUR sample to $scCO_2$ for 0.5 h and solvent density of 650 kg m^{-3}) and the corresponding fitting data is shown in Fig. 2. The inner figure, which represents the same data expressed in terms of mass of CO_2 as a function of the square root of time, shows almost perfect linearity ($R^2 = 0.9997$) therefore confirming the validity of the Fickian approach. Good fit was also observed for all other studied conditions (different temperatures, $scCO_2$ densities and exposure time). The relative deviations between experimental and fitted data were calculated for the initial period (100 s) of the $scCO_2$ desorption curve and were found to be $\pm 10\%$.

The values estimated for the $scCO_2$ desorption diffusion coefficients (D) and $scCO_2$ equilibrium sorption degree (S), at different experimental conditions, are presented in Table 1. In general terms, for each isotherm and $scCO_2$ density, it was observed that both variables (D and S) do not significantly change with exposure time. The estimated equilibrium sorption values indicate that equilibrium is already attained at 0.5 h, for all the experimental conditions tested. This behavior may be justified by the foamed structure of the PUR dressing and consequent high porosity which enhances $scCO_2$ loading into the polymer structure (approximately 80% as calculated from Eq. (2)). Effectively, and based on nitrogen adsorption/desorption data (data not shown), non-processed PUR is highly porous with an average pore surface area of $1.65 \text{ m}^2/\text{g}$ and average pore diameter of 6.17 nm as calculated from the BET (Brunauer-Emmett-Teller) theory. Moreover it presents type IV nitrogen adsorption isotherms with adsorption/desorption hysteresis due to capillary condensation, which is characteristic of mesoporous materials (2–50 nm) [45].

Fig. 3 summarizes data given in Table 1 and elucidates the effect of temperature and solvent density on the sorption capacity (S , %) of $scCO_2$ in PUR samples (Fig. 3a) and on the CO_2 desorption diffusion coefficients ($D \times 10^{-8}$, $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$) (Fig. 3b). Each data point represents the average of the values estimated for the different exposure times (0.5, 2, 4, 8 and 16 h) and for each isotherm and solvent density, considering that equilibrium is achieved after 0.5 h. Results presented in Fig. 3a show that equilibrium sorption capacity (S) increases with solvent density for all isotherms (by 18% at 308 K and 21% at 318 and 328 K) and decreases with temperature for all solvent densities (by 15% at 650 kg m^{-3} , 10% at 750 kg m^{-3} and 13% at 850 kg m^{-3}). As a consequence, the highest solubility of $scCO_2$ in PUR ($\sim 70\%$) was achieved at the lowest temperature and highest solvent density studied (308 K and 850 kg m^{-3}) while the lowest solubility ($\sim 51\%$) was achieved at the highest temperature and lowest solvent density studied (328 K and 650 kg m^{-3}). At

constant temperature, (S) increases with the solvent density (and with pressure) due to the temporary plasticizing effect of $scCO_2$. PUR temporary plasticization increases with the number of CO_2 molecules in-between polymer chains, which favors the swelling of the amorphous component of the polymer and chains mobility/flexibility that can ultimately retain more $scCO_2$ molecules (once pressure is further raised) [46–49]. Nevertheless, and mainly at the higher studied pressures, a compressive effect of the solvent is also believed to occur, since the PUR have significantly higher sorption capacity when immersed in different solvents at room conditions, namely 1617% (water), 987% (ethanol) and 585% (hexane) (data not shown). This means that at the studied process conditions the pressure exerted by the supercritical (dense) fluid over the polymer structure dominates over its plasticizing effect and impairs the matrix to further expand and absorb $scCO_2$. Similar behavior was previously reported by Briscoe and Kelly [46,47] for soft PUR-based elastomers. In those works authors reported the transition pressure (compressive stress dominates over plasticization) to be around 12 MPa at 315 K.

At constant $scCO_2$ density, (S) decreases with temperature mainly due to entropic effects since the kinetic motion of CO_2 molecules increases with temperature which may hinder their diffusion through the pores of the PUR matrix, resulting in a decrease in (S) [47]. The $scCO_2$ sorption capacity of foamed PUR samples (between 50 and 70%) is significantly higher than that previously measured for PUR sheets with 3 mm thickness (which varied between 2.25% at 313 K/67 bar and 4.39% at 313 K/138 bar) [30]. However, similar (S) values were reported by Briscoe and Kelly [47] for soft diphenylmethyl-4,4-diisocyanate polyester based poly(urethane) elastomers (presenting low shore A hardness values due to low hard segment contents). These authors studied materials with three different soft segment compositions and consequently with different glass transition temperatures, T_g (ranging between 241 and 251 K). For the softest sample (more amorphous material with the lowest T_g) authors reported a $scCO_2$ mass uptake of $\sim 50\%$ at 315 K/23 MPa while for the hardest PUR sample the $scCO_2$ mass uptake was $\sim 20\%$, at the same pressure and temperature conditions. The sorption capacity of the PUR sample studied in the present work is higher than 50% (measured at similar process conditions) probably because this PUR sample is softer than those studied by Briscoe and Kelly, as confirmed by its low T_g equal to -49°C (Fig. S2 in Supplementary material), indicating that the soft segments (with higher mobility) predominate over the hard segments and by knowing that sorption is assumed to take place homogeneously only on the amorphous polymer phase). Moreover the higher porosity of the PUR sample used in this work should also have an important role on (S) however Briscoe and Kelly did not report the porosity of their materials and therefore clear comparison cannot be made.

In what regards CO_2 desorption diffusion coefficients (D), and according to Fig. 3b, (D) values present an opposite trend to that observed for (S) since they were found to decrease with $scCO_2$ density for all isotherms (by 44% at 308 K, 33% at 318 K and 26% at 328 K) and to increase with temperature for all densities (by 29% at 650 kg m^{-3} , 22% at 750 kg m^{-3} and 69% at 850 kg m^{-3}). As a consequence, the highest CO_2 desorption coefficient ($3.47 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) was observed at the highest temperature and lowest solvent density studied (328 K and solvent density of 650 kg m^{-3}), while the lowest ($1.49 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) was observed at the lowest temperature and highest solvent density studied (308 K and 850 kg m^{-3}). These results show that the higher the amount of $scCO_2$ that is absorbed by the polymer matrix, the more difficult it is for the CO_2 molecules to escape from it leading to a decrease in (D), as depicted in Fig. 3c. Therefore it seems that entropic factors are controlling the release (desorption) of CO_2 from the PUR samples which can be assumed by considering the porosity and tortuosity of the matrix. In

Table 1
Estimated total amount of scCO₂ absorbed by PUR (M₀), sorption degree (S) and CO₂ desorption coefficient (D), calculated by the analytical solution of Eq. (5).

Time (h)	ρ_{CO_2} (kg m ⁻³) ^a	308 K			318 K			328 K		
		M ₀ (g)	S (%)	D × 10 ⁻⁸ (m ² s ⁻¹)	M ₀ (g)	S (%)	D × 10 ⁻⁸ (m ² s ⁻¹)	M ₀ (g)	S (%)	D × 10 ⁻⁸ (m ² s ⁻¹)
0.5	650	0.54 ± 0.03	60.3 ± 0.1	2.57 ± 0.01	0.43 ± 0.01	55.6 ± 0.3	2.86 ± 0.07	0.38 ± 0.01	53.6 ± 0.2	3.12 ± 0.24
	750	0.53 ± 0.01	59.5 ± 0.1	2.33 ± 0.11	0.48 ± 0.01	66.0 ± 0.4	2.37 ± 0.07	0.45 ± 0.01	55.6 ± 0.2	2.83 ± 0.06
	850	0.80 ± 0.07	71.8 ± 0.1	1.30 ± 0.10	0.67 ± 0.03	66.2 ± 0.6	1.93 ± 0.10	0.52 ± 0.01	60.1 ± 0.1	2.21 ± 0.03
2	650	0.49 ± 0.04	61.9 ± 0.6	2.57 ± 0.13	0.39 ± 0.05	52.7 ± 0.4	3.38 ± 0.21	0.39 ± 0.02	52.4 ± 0.1	3.09 ± 0.38
	750	0.59 ± 0.02	64.2 ± 0.1	2.25 ± 0.05	0.55 ± 0.01	61.0 ± 0.2	2.58 ± 0.05	0.40 ± 0.02	55.0 ± 0.7	2.60 ± 0.32
	850	0.75 ± 0.01	68.6 ± 0.3	1.48 ± 0.03	0.64 ± 0.04	65.6 ± 0.1	2.06 ± 0.14	0.51 ± 0.02	62.0 ± 0.2	2.40 ± 0.01
4	650	0.51 ± 0.01	60.0 ± 0.2	2.43 ± 0.06	0.38 ± 0.04	52.8 ± 1.5	2.92 ± 0.13	0.32 ± 0.02	48.8 ± 0.6	3.34 ± 0.30
	750	0.55 ± 0.04	62.6 ± 0.1	2.47 ± 0.08	0.43 ± 0.01	55.1 ± 0.7	2.59 ± 0.17	0.41 ± 0.02	56.8 ± 0.1	3.17 ± 0.11
	850	0.71 ± 0.05	68.9 ± 0.4	1.39 ± 0.49	0.57 ± 0.01	62.8 ± 0.5	2.10 ± 0.04	0.48 ± 0.05	61.9 ± 0.2	2.58 ± 0.11
8	650	0.44 ± 0.04	58.5 ± 0.3	2.82 ± 0.44	0.33 ± 0.04	50.3 ± 1.4	3.37 ± 0.45	0.32 ± 0.01	47.7 ± 0.4	3.48 ± 0.01
	750	0.51 ± 0.03	60.8 ± 0.4	2.44 ± 0.01	0.44 ± 0.01	57.4 ± 0.1	2.86 ± 0.07	0.42 ± 0.01	55.4 ± 0.3	3.13 ± 0.16
	850	0.75 ± 0.01	70.1 ± 0.8	1.54 ± 0.20	0.56 ± 0.05	64.4 ± 0.5	2.55 ± 0.14	0.47 ± 0.08	60.4 ± 0.2	2.57 ± 0.25
16	650	0.48 ± 0.01	57.3 ± 0.1	2.39 ± 0.02	0.37 ± 0.01	53.5 ± 0.7	3.22 ± 0.11	0.32 ± 0.01	50.4 ± 0.3	3.45 ± 0.25
	750	0.56 ± 0.06	63.7 ± 0.4	2.42 ± 0.01	0.39 ± 0.02	57.4 ± 0.4	2.98 ± 0.12	0.42 ± 0.03	58.3 ± 0.2	2.82 ± 0.03
	850	0.77 ± 0.01	70.8 ± 0.4	1.49 ± 0.07	0.57 ± 0.01	61.9 ± 0.5	1.99 ± 0.27	0.50 ± 0.01	60.6 ± 0.4	2.40 ± 0.09

^a NIST web book.

fact, and although the PUR sample is highly mesoporous, nitrogen adsorption data also indicates the presence of micropores (below 2 nm) that are clogged by nitrogen molecules after nitrogen sorption, as confirmed by the low pressure hysteresis and pore size distribution during nitrogen desorption (data not shown). Therefore, and despite the clear differences that exist between nitrogen and carbon dioxide desorption at different experimental conditions, it is possible to hypothesize that a similar clogging effect may occur during CO₂ desorption due to entrapment of CO₂ molecules into the PUR mesoporous and even into the swollen micropores given kinetic diameters of CO₂ (3.30 Å) [50].

Based on previously discussed equilibrium sorption data, scCO₂ impregnation/deposition conditions were selected in order to study the influence of the amount of scCO₂ solubilized by the PUR sample on the amount of borage oil loaded into the wound dressing matrix. Impregnation/deposition conditions and respective total borage oil loaded amounts are presented in Table 2. Since a large excess of borage oil was inserted into the high pressure equilibrium cell during the impregnation/deposition experiments, the equilibrium solubility of borage oil in scCO₂, at each experimental condition, is guaranteed and consequently the amount of oil impregnated depends on the oil's solubility in scCO₂ and on scCO₂ PUR sorption capacity at each specific experimental condition. Impregnation experiments were carried out for 3 h to assure complete dissolution of the oil in scCO₂ and increase the contact time between the oil and the PUR sample, knowing that time does not significantly affect sorption, as discussed before. According to data presented in Table 2, the highest oil impregnated amount (132 ± 4.7 µg oil/g PUR) was observed at the highest temperature and solvent density studied (328 K and 850 kg m⁻³). This experimental condition corresponds to the highest solubility of borage oil in scCO₂ (among all the tested conditions), but does not correspond to the maximum scCO₂ sorption capacity of PUR. At the highest sorption capacity (71% at 308 K and 850 kg m⁻³), the amount of borage oil impregnated/deposited is almost half of that observed at the highest temperature and solvent density (73 ± 3.6 µg oil/g PUR). These results indicate that in this particular system, the solubility of borage oil in scCO₂ plays a major role in the impregnation/deposition process. This is further confirmed by the result obtained at the lowest temperature and solvent density (308 K and 650 kg m⁻³). In this case, the low solubility of the oil in scCO₂ leads to low oil loaded amount, even for a PUR sorption capacity similar to that corresponding to the highest impregnated amount (~60%). Loaded oil had a minimal effect on the thermomechanical proper-

ties of the PUR sample with no effect on the T_g of the polymer and only a small shift (±5 K higher) on its degradation temperature (Fig. S2 in Supplementary material).

Previous studies [51,52] have reported the extraction of borage seed oil using liquid and scCO₂ as solvents and concluded that highest extraction yields (~29% wt) can be obtained when using extraction conditions similar to those that originated higher oil loading yield in the present work (313 K and 30 MPa). Although authors reported similar yields obtained when using more conventional extraction techniques, they also refer the higher quality of the oil extracted by SFE which was rich in unsaturated fatty acids, especially the γ -linoleic acid (~22%) and the low extra purification and refining procedures since the oil extracted by SFE is a solvent free. This is particularly important when the development of biomedical devices is envisaged.

The composition of the loaded oil was analyzed by FTIR-ATR and HPLC. The IR spectra of both loaded and non-loaded samples were very similar and no specific bands characteristic from the oil were detected (data not shown). This result may indicate that the oil was homogeneously dispersed within the matrix and not only adsorbed at the surface of the PUR samples. On the contrary, and according to Fig. 4, HPLC results show that the chromatographic profile obtained for the extract released from the PUR sample, loaded at a solvent density of 850 kg m⁻³ (30 MPa and 328 K) is very similar to that obtained for the pure oil. Small peaks detected near retention time of 10 min may be due to co-extracted substances from the polymer. These results indicate that all the compounds (detected at 205 nm by HPLC) that exist in pure borage oil (mainly fatty acids and triacylglycerols of γ -linolenic acid, linoleic acid and α -linolenic acid [43,51,52]) were successfully loaded into the PUR sample. These compounds are known to have a positive effect on health by generating potent modulatory molecules for inflammatory responses and affecting the gene expression of various bioactive molecules [53]. Borage oil is particularly rich in γ -linolenic acid which has previously demonstrated anti-inflammatory and anti-cancer activities as well as beneficial healing effects in diabetic patients [37–40]. The differences observed in the relative areas of the peaks identified in each chromatogram are mainly justified by differences in the solubility in scCO₂ but also by the different affinities of those compounds for the PUR chemical structure (extensive identification/quantification of individual compounds present in the oil or loaded into the matrix is out of the scope of this work).

Wound dressing's hydrophilicity and gas permeability are important parameters that should be accounted when choos-

Table 2
Total amount of borage oil impregnated at different experimental conditions.

T (K)	P (MPa)	ρ scCO ₂ (kg m ⁻³)	scCO ₂ sorption [†] (%)	Solubility of oil in scCO ₂ (kg m ⁻³)	Mass of oil/Mass of PUR (μg/g) (%)	Water contact angle (°)	Water vapor transmission rate g m ⁻² d ⁻¹	Water vapor permeability kg. (s m Pa) ⁻¹ (×10 ⁻¹⁵)	Surface area (m ² /g)
308	8.9	650	59.8	0.69 [*]	32 ± 1.4 (3.0%)	100.3 ± 1.4	1164 ± 130.4	8.52 ± 0.95	–
308	18.3	850	70.6	4.76 [*]	73 ± 3.6 (6.7%)	101.8 ± 2.1	1125 ± 106.7	8.26 ± 0.78	11.04 ± 0.57
328	30.0	850	60.4	9.96 [42]	132 ± 4.7 (11.8%)	108.2 ± 3.4	1347 ± 21.3	9.83 ± 0.30	9.65 ± 0.31
Non-loaded PUR sample			--	--	--	98.3 ± 0.9	1277 ± 3.5	8.79 ± 0.02	1.65 ± 0.08

[†] Average data taken from Table 1.

^{*} The values were calculated by the Chrastil model as suggested in [42].

ing a material for wound healing purposes. Hydrophilicity may affect adhesion properties and exudates removal capacity while gas exchange between the wound bed and the exterior is essential to assure a proper healing environment [4]. Besides oxygen, carbon dioxide and nitric oxide exchange, water vapor permeability should also be controlled by the wound dressing since injured skin may lose up to 200 gm⁻² h⁻¹ (which is 20 times higher than that of healthy skin ~10 gm⁻² h⁻¹) [54]. Therefore, the effect of the incorporation of a hydrophobic oil on those parameters was evaluated through water contact angle, water vapor transmission rate (WVTR) and water vapor permeability (WVP) measurements and, the results are given in Table 2. A slight increase in the water contact angle (~10%) was observed only when comparing the non-loaded sample (98.3 ± 0.9°) with that loaded with the highest amount of borage oil, indicating a slight increase in the wound dressing hydrophobicity due to the presence of the oil. No significant change was observed for the samples loaded with a lower amount of borage oil. As can be also seen in Table 2 the water vapor permeation capacity of loaded PUR samples decreases with the amount of loaded oil (up to 12%) for the samples loaded at the lowest studied temperature and pressure. This may be explained by the presence of the oil into the PUR structure that difficult diffusion of the water vapor molecules by blocking the mesoporous and inducing repellency due to its hydrophobic character. However the sample loaded at the highest temperature and pressure presents WVTR and WVP similar to that of the non-loaded sample due to a rearrange of the PUR structure (larger pores, higher interconnectivity and lower tortuosity) after processing that balances the effect of the oil in the matrix. This hypothesis was confirmed by comparing the BET surface areas and average pore diameters of non-loaded and PUR loaded samples (at 328 K and 30 MPa) which increased from 1.65 to 9.65 m²/g and from 6.17 to 14.49 nm, respectively. Nevertheless, borage oil loaded samples present WVTR that range between 1120–1350 gm⁻² d⁻¹ which are higher than those reported for typical PUR dressings commercially available such as Tegaderm®, Bioclusive® and OpSite®, which have WVTRs of 491 ± 44, 394 ± 12, and 792 ± 32 gm⁻² d⁻¹, respectively and may therefore help to prevent exudate accumulation which decelerates the healing process and increases the risk of bacterial contamination [55]. It is important to refer that in this work only the foamed part of the commercial dressing was studied and therefore these values should not be extrapolated for the commercial foam dressing.

5. Conclusions

This study reports the scCO₂ sorption capacity of a commercial polyurethane-based wound dressing. Experimental data were measured by a gravimetric method for different isotherms, scCO₂ densities and scCO₂ exposure times and modeled using both numerical and analytical solution of Fick's second law. Both methodologies were capable to correctly fit experimental data with

relative error percentages lower than 10%. The sorption capacity of the studied polyurethane-based material was found to increase with scCO₂ density and decrease with temperature. Moreover, equilibrium is rapidly achieved (<0.5 h) probably due to the high porosity of the matrix used in this work. Based on scCO₂ sorption results, different experimental conditions were studied in order to control the amount of borage oil that can be loaded into the polyurethane wound dressing. Obtained results show that the highest borage oil loading yield was observed at high temperatures and high scCO₂ densities. This means that the loading process is mainly controlled by the solubility of the oil into scCO₂ and by the oil-polyurethane favorable interactions and not by the scCO₂ sorption capacity of the polyurethane. Overall, and also considering previously reported data on the quality of borage oil extracted by SFE, these results indicate the feasibility of an integrated SFE plus SSI system, capable to sequentially extract γ -linoleic acid enriched oil from borage and homogeneously impregnate/deposit it into polymer matrices, originating solvent free bioactive wound dressing materials.

Acknowledgements

This work was financially supported by FCT-Portugal/CAPES-Brazil under contract FCT/CAPES 355/2013 and Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT-MEC) under contract PEst-C/EQB/UI0102/2011. M.E.M. Braga acknowledges FCT-MEC for the scholarship SFRH/BPD/101048/2014. A.M.A. Dias acknowledges FCT-MEC for a contract under the program Investigador FCT IF/00455/2013. Authors gratefully acknowledge Dr. Rakesh Kapoor from Bioriginal Food & Science Corporation, Canada who kindly supplied the borage oil sample used in this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.04.007>.

References

- [1] G.D. Mogosanu, A.M. Grumezescu, Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing, *Int. J. Pharm.* 463 (2014) 127–136.
- [2] J. Zhang, D.J. Martin, E. Taran, K.J. Thurecht, R.F. Minchin, Effect of supercritical carbon dioxide on the loading and release of model drugs from polyurethane films: comparison with solvent casting, *Macromol. Chem. Phys.* 215 (2014) 54–64.
- [3] F.J. Davis, G.R. Mitchell, Polyurethane based materials with applications in medical devices, in: P. Bartolo, B. Bidanda (Eds.), *Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine*, Springer, New York, 2008, pp. 27–47.
- [4] L.I.F. Moura, A.M.A. Dias, E. Carvalho, H.C. de Sousa, Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—a review, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7093–7114.
- [5] V. Jones, J.E. Grey, K.G. Harding, ABC of wound healing: wound dressings, *Br. Med. J.* 332 (2006) 770–780.

- [6] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N.E. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2892–2923.
- [7] B. Li, K.V. Brown, J.C. Wenke, S.A. Guelcher, Sustained release of vancomycin from polyurethane scaffolds inhibits infection of bone wounds in a rat femoral segmental defect model, *J. Control. Release* 145 (2010) 221–230.
- [8] J.M. Schierholz, H. Steinhäuser, A.F.E. Rumps, R. Berkels, G. Pulverer, Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: morphological and structural features, *Biomaterials* 18 (1997) 839–844.
- [9] A.R. Unnithan, N.A.M. Barakat, P.B.T. Pichiah, G. Gnanasekaran, R. Nirmala, Y.-S. Cha, C.H. Jung, M. El-Newehy, H.Y. Kim, Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospon polyurethane-dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1786–1793.
- [10] P. Basak, B. Adhikari, I. Banerjee, T.K. Maiti, Sustained release of antibiotic from polyurethane coated implant materials, *J. Mater. Sci.* 20 (2009) S213–S221.
- [11] Q. Guo, P.T. Knight, J. Wu, P.T. Mather, Blends of paclitaxel with POSS-based biodegradable polyurethanes: morphology, miscibility, and specific interactions, *Macromolecules* 43 (2010) 4991–4999.
- [12] E.H. Seo, K. Na, Polyurethane membrane with porous surface for controlled drug release in drug eluting stent, *Biomater. Res.* 18 (2014) 1–5.
- [13] D.L. Tomasko, H. Li, D. Liu, X. Han, M.J. Wingert, L.J. Lee, K.W. Koelling, A review of CO₂ applications in the processing of polymers, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 6431–6456.
- [14] S.G. Kazarian, Polymer processing with supercritical fluids, *Polym. Sci. Ser. C* 42 (2000) 78–101.
- [15] I. Kikic, F. Vecchione, Supercritical impregnation of polymers, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 7 (2003) 399–405.
- [16] S. Üzer, U. Akman, O. Hortaçsu, Polymer swelling and impregnation using supercritical CO₂: A model-component study towards producing controlled-release drugs, *J. Supercrit. Fluids* 38 (2006) 119–128.
- [17] I. Kikic, Polymer-supercritical fluid interactions, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2009) 458–465.
- [18] A. Jiménez, G.L. Thompson, M.A. Matthews, T.A. Davis, K. Crocker, J.S. Lyons, A. Trapotis, Compatibility of medical-grade polymers with dense CO₂, *J. Supercrit. Fluids* 42 (2007) 366–372.
- [19] A. Salerno, C.D. Pascual, Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering, *Process Biochem.* 50 (2015) 826–838.
- [20] G. Tkalec, M. Pantic, Z. Novak, Z. Knez, Supercritical impregnation of drugs and supercritical fluid deposition of metals into aerogels, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 1–12.
- [21] S.M. Howdle, M.S. Watson, V.K. Whitaker, M.C. Davies, F.S. Mandel, J.D. Wang, K.M. Shakesheff, Supercritical fluid mixing: preparation of thermally sensitive polymer composites containing bioactive materials, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (2001) 109–110.
- [22] P.J. Ginty, M.J. Whitaker, K.M. Shakesheff, S.M. Howdle, Drug delivery goes supercritical, *Mater. Today* 8 (2005) 42–48.
- [23] S.P. Nalawade, F. Picchioni, L.P.B.M. Janssen, Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: processing aspects and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 19–43.
- [24] V.P. Costa, M.E.M. Braga, J.P. Guerra, A.R.C. Duarte, E.O.B. Leite, C.M.M. Duarte, M.H. Gil, H.C. de Sousa, Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method, *J. Supercrit. Fluids* 52 (2010) 306–316.
- [25] A.M.A. Dias, M.E.M. Braga, I.J. Seabra, P. Ferreira, M.H. Gil, H.C. Sousa, Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide, *Int. J. Pharm.* 408 (2011) 9–19.
- [26] M.E.M. Braga, M.T.V. Pato, H.S.R.C. Silva, E.I. Ferreira, M.H. Gil, C.M.M. Duarte, H.C. Sousa, Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives, *J. Supercrit. Fluids* 44 (2008) 245–257.
- [27] S.P. Nalawade, F. Picchioni, J.H. Marsman, L.P.B.M. Janssen, The FT-IR studies of the interactions of CO₂ and polymers having different chain groups, *J. Supercrit. Fluids* 36 (2006) 236–244.
- [28] J.R. Fried, W. Li, High-pressure FTIR studies of gas-polymer interactions, *J. Appl. Polym. Sci.* 41 (1990) 1123–1131.
- [29] S.G. Kazarian, M.F. Vincent, F.V. Bright, C.L. Liotta, C.A. Eckert, Specific intermolecular interaction of carbon dioxide with polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 1729–1736.
- [30] Y.T. Shieh, J.H. Su, G. Manivannan, P.H.C. Lee, S.P. Sawan, W.D. Spall, Interaction of supercritical carbon dioxide with polymers. II. Amorphous polymers, *J. Appl. Polym. Sci.* 59 (1996) 707–717.
- [31] R.G. Wissinger, M.E. Paulaties, Swelling and sorption in polymer-CO₂ mixtures at elevated pressures, *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* 25 (1987) 2497–2510.
- [32] J.H. Aubert, Solubility of carbon dioxide in polymers by the quartz crystal microbalance technique, *J. Supercrit. Fluids* 11 (1998) 163–172.
- [33] A.R. Berens, G.S. Huvard, R.W. Korsmeyer, F.W. Kunig, Application of compressed carbon dioxide in the incorporation of additives into polymers, *J. Appl. Polym. Sci.* 46 (1992) 231–242.
- [34] N.H. Brantley, S.G. Kazarian, C.A. Eckert, In situ FTIR measurement of carbon dioxide sorption into poly(ethylene terephthalate) at elevated pressures, *J. Appl. Polym. Sci.* 77 (2000) 764–775.
- [35] A.R.C. Duarte, L.E. Anderson, C.M.M. Duarte, S.G. Kazarian, A comparison between gravimetric and in situ spectroscopic methods to measure the sorption of CO₂ in a biocompatible polymer, *J. Supercrit. Fluids* 36 (2005) 160–165.
- [36] A.R.C. Duarte, C. Martins, P. Coimbra, M.H.M. Gil, H.C. Sousa, C.M.M. Duarte, Sorption and diffusion of dense carbon dioxide in a biocompatible polymer, *J. Supercrit. Fluids* 38 (2006) 392–398.
- [37] M.R. Farahpour, A.H. Mavaddati, Effects of borage extract in rat skin wound healing model, histopathological study, *J. Med. Plants Res.* 6 (2012) 651–656.
- [38] C.R.B. Cardoso, M.A. Souza, E.A.V. Ferro, S. Favoreto Jr., J.D.O. Pena, Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds, *Wound Repair Regen.* 12 (2004) 235–243.
- [39] M. Pieszak, P.L. Mikołajczak, K. Manikowska, Borage (*Borago officinalis* L.)—a valuable medicinal plant used in herbal medicine, *Herba Polonica* 58 (2012) 95–101.
- [40] R. Kapoor, Y.S. Huang, Gamma linolenic acid: an anti-inflammatory omega-6 fatty acid, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7 (2006) 1–4.
- [41] A.M.A. Dias, A. Rey-Ricob, R.A. Oliveira, S. Marceneiro, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, R.N.C. Júnior, M.E.M. Braga, H.C. Sousa, Wound dressings loaded with an anti-inflammatory júcá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology, *J. Supercrit. Fluids* 74 (2013) 34–45.
- [42] F. Gaspar, T. Lu, R. Marriott, S. Mellor, C. Watkinson, B. Al-Duri, R. Santos, J. Seville, Solubility of echium, borage, and lunaria seed oils in compressed CO₂, *J. Chem. Eng. Data* 48 (2003) 107–109.
- [43] M. Lísá, M. Holčápek, Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography—atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1198–1199 (2008) 115–130.
- [44] American Society for Testing and Materials ASTM E96-90D: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 2010.
- [45] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, *IUPAC* 57 (1985) 603–619.
- [46] B.J. Briscoe, C.T. Kelly, The plasticization of a polyurethane by carbon dioxide at high pneumatic stresses, *Polymer* 36 (1995) 3099–3102.
- [47] B.J. Briscoe, C.T. Kelly, The effect of structure on gas solubility and gas induced dilation in a series of poly(urethane) elastomers, *Polymer* 37 (1996) 3405–3410.
- [48] M. Tang, T.B. Du, Y.P. Chen, Sorption and diffusion of supercritical carbon dioxide in polycarbonate, *J. Supercrit. Fluids* 28 (2004) 207–218.
- [49] E. Aionicesei, M. Škerget, Ž. Knez, Measurement and modeling of the CO₂ solubility in poly(ethylene glycol) of different molecular weights, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 185–188.
- [50] J.R. Li, Y. Ma, M.C. McCarthy, J. Sculley, J. Yu, H.K. Jeong, P.B. Balbuena, H.C. Zhou, Carbon dioxide capture-related gas adsorption and separation in metal-organic frameworks, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 1791–1823.
- [51] A.M. Gómez, E.M. Ossa, Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide, *Chem. Eng. J.* 88 (2002) 103–109.
- [52] J.L. Guill-Guerrero, J.C. López-Martínez, P. Campra-Madrid, Gamma-linolenic extraction from seed by SCF and several solvent systems, *Int. J. Food Sci. Technol.* 43 (2008) 1176–1180.
- [53] R. Marion-Letellier, G. Savoye, S. Ghosh, Polyunsaturated fatty acids and inflammation, *IUBMB Life* 67 (2015) 659–667.
- [54] A. Nangia, C.T. Hung, Design of a new hydrocolloid dressing, *Burns* 15 (1989) 385–388.
- [55] P. Wu, A.C. Fisher, P.P. Foo, D. Queen, J.D.S. Gaylor, In vitro assessment of water vapor transmission of synthetic wound dressings, *Biomaterials* 16 (1995) 171–175.

Supplementary Material

C.V. da Silva, V.J. Pereira, P.T.V. Rosa, E.C.M. Cabral-Albuquerque, S.A.B.Vieira de Melo, G.M.N.

Costa, A.M.A. Dias, H.C. de Sousa, M.E.M. Braga

Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing.

02 pages, 02 figures

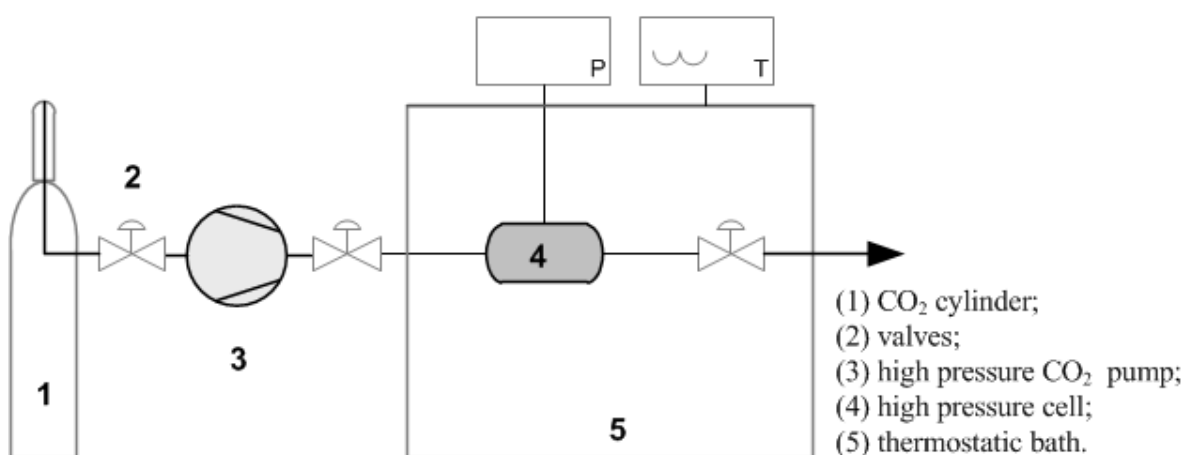


Figure S1. Schematic diagram of the employed sorption apparatus: (1) CO₂ cylinder; (2) valves; (3) high pressure CO₂ pump; (4) high pressure cell; (5) thermostatic bath.

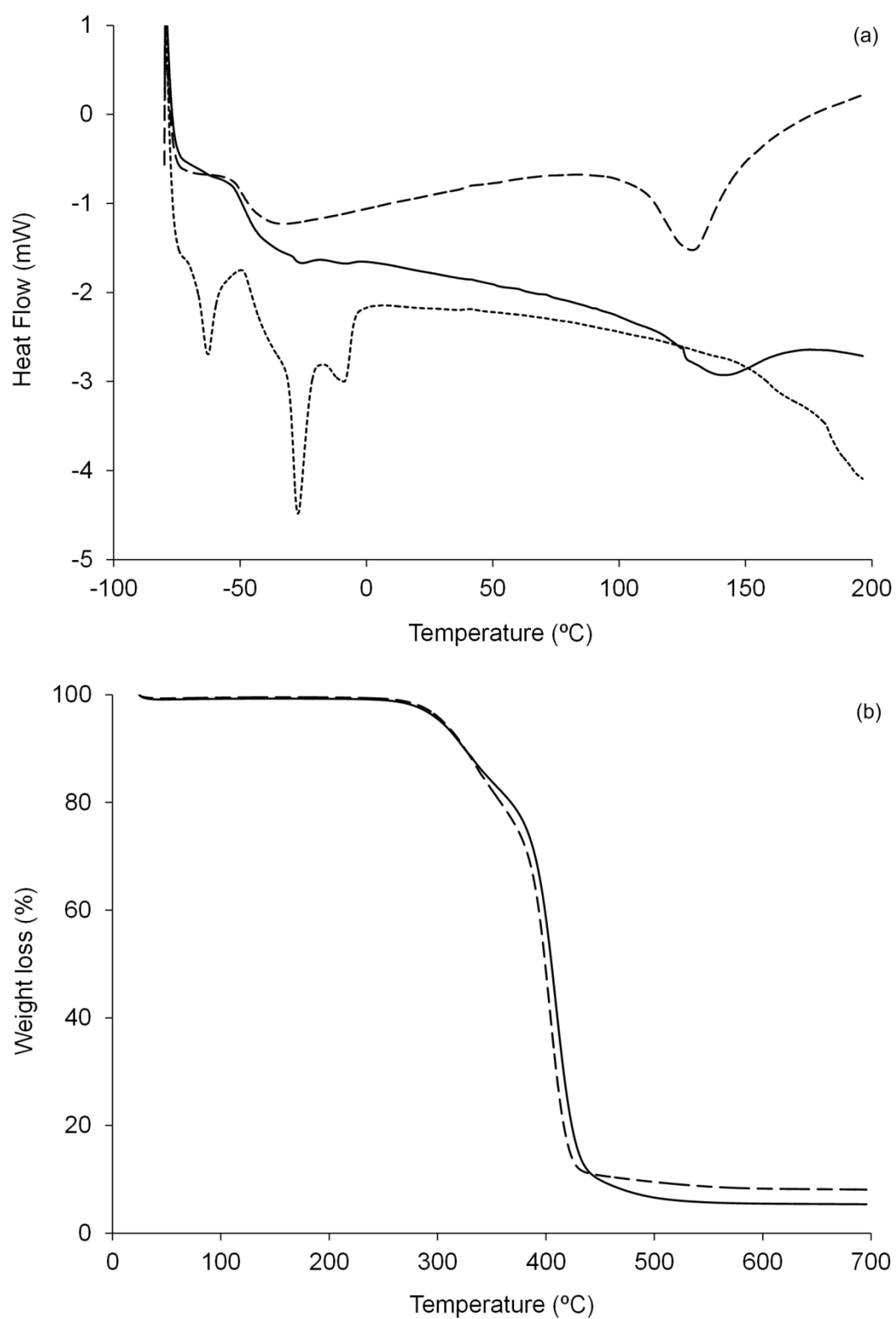


Figure S2. Calorimetric profile of borage oil (short dashed line), non-loaded PUR (long dashed line) and borage oil loaded PUR (at 328 K and 30 MPa) (full line) (a); thermogravimetric profiles of non-loaded (dashed line) on borage oil loaded PUR (at 328 K and 30 MPa) (full line) (b).



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu

Supercritical solvent impregnation/deposition of spilanthol-enriched extracts into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing

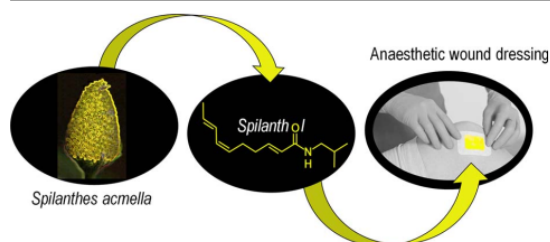


C.V. da Silva^a, V.J. Pereira^a, G.M.N. Costa^a, E.C.M. Cabral-Albuquerque^{a,*}, S.A.B. Vieira de Melo^a, H.C. de Sousa^b, A.M.A. Dias^{b,*}, M.E.M. Braga^{b,*}

^a Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Rua Aristides Novis, 2, Federação, 40210-630, Salvador, Bahia, Brazil

^b CIEPQPF, Chemical Engineering Department, FCTUC, University of Coimbra, Rua Sílvio Lima, Pólo II – Pinhal de Marrocos, 3030-790, Coimbra, Portugal

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

scCO₂ sorption
scCO₂ impregnation/deposition
Jambu flowers extract
Promogran[®] wound dressing

ABSTRACT

A natural-based commercial wound dressing (Promogran[®]) was loaded with a spilanthol-enriched extract obtained from jambu (*Spilanthes acmella*) flowers using a supercritical solvent impregnation/deposition method (SSI/SSD). The applied SSI/SSD experimental conditions were selected based on equilibrium scCO₂ sorption experimental data. Equilibrium sorption degrees and CO₂ desorption diffusion coefficients were calculated from desorption curves which were modelled using the analytical solution of Fick's second law. The SSI/SSD loading yield was evaluated at the highest equilibrium scCO₂ sorption degree with and without using ethanol as co-solvent. Gas chromatography–mass spectroscopy analysis confirmed that all the components of the extract were loaded into the wound dressing, including spilanthol, which is well-known for its anesthetic/analgesic activity. Promogran[®] samples loaded with jambu extract were also characterized for their morphological and physico-chemical properties (hydrophobicity and water vapor permeability) and the obtained results allowed concluding that the process did not significantly affect the original properties of the wound dressing.

1. Introduction

Wound dressings are usually used to enhance the wound healing process namely by regulating moisture and permeability of the wound environment to oxygen and water vapor and by protecting wounds from external deleterious factors (such as microorganisms and/or mechanical injuries) [1].

The incorporation of active pharmaceutical ingredients (APIs) (such as anti-inflammatories, anti-microbials, anesthetics, etc.) into wound dressings further helps to accelerate the healing process by preventing inflammation, bacterial infection or by promoting/controlling tissue regeneration and scar formation [2,3].

Current pharmacotherapy approaches for the management of severe wounds (deep, chronic or post-operative) are usually systemic and

* Corresponding authors.

E-mail addresses: elainemca@ufba.br (E.C.M. Cabral-Albuquerque), adias@eq.uc.pt (A.M.A. Dias), marabraga@eq.uc.pt (M.E.M. Braga).

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.028>

Received 2 August 2017; Received in revised form 27 November 2017; Accepted 27 November 2017

Available online 28 November 2017

0896-8446/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

consist in the administration of anti-inflammatory and anti-bacterial, opioid analgesics and adjuvants. However, these drugs often induce adverse reactions and chronic pain, particularly those intended for nerve injury healing [4,5]. The topical application of analgesics/anaesthetics incorporated into wound dressings represents an advantageous alternative approach to control pain, with minimum systemic side effects [5].

The most frequently used methods to load API(s) into polymer-based medicines or combination devices normally consist in conventional pharmaceutical processing methods such as physical mixing and heterogeneous dispersion of the active compounds by immersion/soaking of polymer matrices into organic or aqueous solutions/dispersions in which the drug(s) have been previously dissolved or dispersed [6–9], or by the incorporation of the API(s) during polymer synthesis and/or processing [5,10,8,9]. However, these methods are usually time consuming, may involve multiple processing steps, often require the use of harmful organic solvents, and may lead to API(s) loss or chemical/thermal degradation. Furthermore, some biopolymers can deform (shrink/swell) and/or dissolve when in contact with organic solvents which may change their 3D structural properties as well as impair the loading of API(s) via conventional impregnation/deposition techniques [11–13].

Supercritical solvent impregnation/deposition (SSI/SSD) technology has already proven its applicability and advantageous features for the preparation of drug-loaded polymer-based drug delivery systems (including some based on natural-origin polymers), as well as its efficiency when compared to other impregnation/deposition methods [14–18]. Some of these advantages are related to the temporary plasticizing/swelling effect of supercritical fluids, which facilitates mass transport through some polymer matrices and thus enhances the absorption kinetics of the diffusing substances, enabling faster and more homogeneous impregnation/deposition, when compared to liquid-based impregnation/deposition processes [15,3,14,18–20]. Supercritical carbon dioxide (scCO₂) is the most used supercritical fluid since it is a GRAS solvent, nonflammable and readily available at low cost. Additionally, scCO₂ is inert to most substances; can be simultaneously used to sterilize the employed biopolymer matrices [21–23]; and permits the processing at mild temperature conditions therefore avoiding chemical and thermal degradation of API and/or polymers.

However, and despite these beneficial features scCO₂ also presents some limitations namely due to its inability to dissolve high molecular mass and highly polar molecules. To overcome these issues, the addition of surfactants or small amounts of co-solvents (e.g. ethanol) can significantly favor SSD/SSI yields [24–28].

The efficiency of the SSI/SSD processes using scCO₂ mostly depends on thermodynamic and mass transfer issues and specifically on the knowledge of the relative magnitudes of the binary physicochemical interactions (API + scCO₂, API + polymer and scCO₂ + polymer) that can be established between the components of this ternary system. This means that in general terms, the SSI/SSD yields will strongly depend on the solubility of the API in scCO₂, on the favourable API + polymer interactions and on the amount of scCO₂ that can be absorbed by the polymer. The later depends on the chemical and structural nature of the matrix and on the physicochemical properties of the polymer and of scCO₂ (e.g. density and viscosity, which are pressure and temperature dependent) [29,30]. Moreover, the contact time between scCO₂ (with or without dissolved API) and the polymer, as well as the depressurization rate will also affect SSI/SSD yields [15,20,31–33].

The main objective of this work was to obtain a fully natural-based bioactive wound dressing prepared using biodegradable and biocompatible polymers loaded with a natural-origin extract by using greener methods and solvents (scCO₂ and ethanol). For that purpose, a commercially available wound dressing, Promogran® (composed by 45% oxidized regenerated cellulose and 55% collagen type I) was loaded with a spilanthol-enriched extract obtained from jambu (*Spilanthes acmella* var *oleraceae*) flowers using a SSI/SSD method and

scCO₂ or scCO₂ + ethanol (95:5, % molar) as solvent carriers. Spilanthol is an alkylamide with proven anesthetic, analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-fungal and insecticidal bioactivities [34,35]. Over the last years, the extracts obtained from jambu (mainly from its flowers) have been extensively studied for different biological applications and presented promising results, for example: *in vivo* pharmacological tests using chitosan films loaded with 10% of jambu ethanolic extract (w/w) showed potential to be used as an anesthetic for the oral mucosa [36]; jambu methanolic extracts were encapsulated into carbopol gel (1% w/w) and presented an anti-inflammatory activity which was comparable to the one of commercial diclofenac sodium gel [37]; hydroxyethyl cellulose films loaded with a jambu extract (15% w/w) and macela essential oil (1.5% w/w) presented anesthetic, anti-inflammatory and wound healing capacity [5]; a topical formulation containing a jambu extract (1% w/w) and *Cistus ladanifer* oil was recently patented due to its strong analgesic efficiency [38]. Furthermore, and in order to optimize extract loading yields, the equilibrium scCO₂ sorption degrees of Promogran® were also measured, at different experimental conditions (temperature, solvent density and exposure time), using a gravimetric method, to determine the conditions that would enhance scCO₂ diffusion into Promogran® matrix at minimum exposure time. Finally, the effect of SSI/SSD processing over the morphological and physicochemical properties of the commercial wound dressing was also evaluated in this work.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Promogran® wound dressings (composed by 45% oxidized regenerated cellulose and 55% collagen type I) were kindly donated by Systagenix, USA (currently Acelyty, USA). Carbon dioxide (99.5%) was obtained from Praxair (Spain), ethanol (99.9%) was obtained from Scharlab (Spain) and *n*-hexane (99.9%) and ethyl acetate (99.9%) were both obtained from Carlo Erba Reagents (Italy). MilliQ distilled water (MilliQ water, Millipore, 18 MΩ cm) was used for contact angle and water vapor permeation measurements. Jambu flowers extract was obtained and characterized following the procedures presented in a previous work [35].

2.2. ScCO₂ sorption/desorption measurements

The scCO₂ sorption on Promogran® samples was estimated from scCO₂ desorption measurements using a gravimetric procedure previously described in the literature [39,40]. Briefly, a pre-weighed Promogran® sample (~1.0 × 3.0 × 0.2 cm), previously dried at 313 K for at least 24 h (up to 0.7% humidity), was inserted inside a quick opening high pressure stainless steel cell (10 ml from Waters Co.), which was placed in a thermal bath at a controlled temperature (± 1 K). Sorption measurements were performed at fixed temperatures (308 and 318 K) and solvent densities (650 kg m⁻³, 750 kg m⁻³ and 850 kg m⁻³) and for different scCO₂ exposure times (1, 2, 4, 8 and 16 h). Pressurization (± 0.5 bar) was achieved by pumping CO₂ using a liquid syringe pump (Teledyne Isco 260D).

At the end of the sorption period, the cell is rapidly opened and depressurized (± 30 s) and the sample is quickly transferred to an electronic digital balance (Sartorius CPA225D, sensitivity 0.01 mg). The sample mass is recorded at short time intervals (2 s) until mass stabilization occurs using a computerized data acquisition system (RS Key 1.4 software – A&D Company, Limited – Japan) during desorption at atmospheric pressure. All sorption experiments were replicated (at least duplicated).

The absorbed/adsorbed amount of scCO₂ (M_0) were determined from the obtained desorption curves, which were adjusted using a model derived from Fick's 2nd law (Eq. (1)) when applied to a rectangular geometry and unidirectional flow:

$$M(t) = \frac{8M_0}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left[-\frac{(2n+1)\pi^2}{l^2} Dt\right] \quad (1)$$

where $M(t)$ is the residual mass of CO_2 in the Promogran[®] sample at time t and D is the CO_2 desorption diffusion coefficient. The D values were determined using a Nelder-Mead simplex algorithm and following a procedure presented in a previous work [35]. Before applying Eq. (1), experimental CO_2 desorption data were correlated by linear regression ($M(t)$ vs $t^{0.5}$ as represented in Fig. S1) in order to obtain a larger number of extrapolated points to improve the correlation of the CO_2 desorption curve at shorter periods (lower than 30 s). It is important to refer that M_0 includes both scCO_2 that is adsorbed (due to favourable interactions between CO_2 and the biopolymers present in the wound dressing) and scCO_2 that is absorbed by Promogran[®] (which will mostly depend on the porosity of the matrix). Taking this into account, the scCO_2 sorption degrees were calculated from Eq. (2):

$$S(\%) = \frac{M_0}{M_0 + M_i} \times 100 \quad (2)$$

Where M_0 is obtained from Eq. (1) and M_i is the initial mass of the sample.

2.3. ScCO_2 impregnation/deposition (SSI/SSD) of the extract of jambu flowers into Promogran[®] samples

The high pressure apparatus employed to perform the SSI/SSD experiments was already described in the literature [15,31,32,33]. It consists of a compressed CO_2 liquid pump connected to a high pressure stainless steel vessel (internal volume $\sim 14 \text{ cm}^3$), a temperature controlled bath, a pressure transducer and a magnetic stirring plate (working at 700 rpm). Stirring is necessary to help the dissolution and the homogenization of the jambu flowers extract and the supercritical solvent phase (scCO_2 or scCO_2 /ethanol mixture (95:5% molar)). Six Promogran[®] pre-weighed samples ($\sim 1.0 \times 1.0 \times 0.2 \text{ cm}$) which were previously dried at 313 K for at least 24 h, were vertically inserted into stainless steel supports and placed inside the high-pressure cell that already contained a known amount of spilanthol-enriched jambu extract ($\sim 100 \text{ mg}$). The extract was previously obtained by supercritical fluid extraction (SFE) at different experimental conditions ranging between 323 and 343 K and 700–900 kg m^{-3} [35]. The amount of extract employed for the impregnation/deposition experiments was established based on indirect solubility data of this extract in scCO_2 [35] which was $\sim 10 \text{ mg}$ at the experimental conditions used in this work. An excess amount of jambu extract (~ 10 times higher) was used to guarantee that equilibrium solubility is attained and that the extract is completely solubilized in the fluid phase (pure scCO_2 or $\text{scCO}_2 + \text{ethanol}$).

The SSI/SSD experiments were carried out at 308 K and different solvent densities (650, 750 and 850 kg m^{-3}) and for 4 h. These conditions (temperature, solvent density) took into account the previously obtained sorption data, namely in terms of those that led to higher sorption degrees. The system was then depressurized at a slow rate (5 bar min^{-1}) in order to avoid deformation of the samples (samples shrank when processed at depressurization rates higher than 10 bar min^{-1}).

2.4. Quantification of the total amount of jambu extract loaded into Promogran[®] samples by scCO_2 impregnation/deposition (SSI/SSD)

The total amounts of extract that were loaded into Promogran[®] samples were quantified gravimetrically after the complete leaching of processed samples in n -hexane (72 h), under stirring and at 310 K. The leaching solvent was collected in pre-weighed vials and evaporated under ambient conditions (protected from light). The extracts leached from the Promogran[®] samples were stored in a desiccator and weighted during regular time intervals until constant weight was achieved to

guarantee that the solvent (n -hexane) was completely evaporated. The leached extracts were quantified gravimetrically and characterized by GC (Agilent Technologies, USA, model GC 7890A), ion trap mass detector (G3171A MSD), silica capillary column (30 m \times 0.32 mm i.d.; df, 0.25 μm), 100% dimethylpolysiloxane (HP-1 ms, Agilent-J&W Scientific). The temperature program was the following: 353 K for 5 min, ramped up to 553 K (at 4 K min^{-1}) and maintained for 10 min at this temperature. Helium was used as the carrier gas (1.0 ml min^{-1}). The transfer line, quadrupole and ion source were kept at 513, 423 and 503 K, respectively. All leached extract samples were injected (0.1 μl) in PTN splitless mode (solubilized in ethyl acetate, 10 mg ml^{-1}). The identification of the individual substances present in the extracts was performed by comparing their mass spectra with the mass spectral database libraries from NIST (National Institute of Standards and Technology). The quantification of spilanthol loaded into Promogran[®] samples was made by GC-FID using the same column and programing that was used for GC-MS analysis and injector and detector temperatures of 353 K and 373 K, respectively. The amount of spilanthol present in each loaded/released extract was quantified using a calibration curve of a spilanthol standard isolated in a previous work [35] by injecting 1.2 μl of extract, dissolved in ethyl acetate at 5 mg ml^{-1} , in split less mode. All samples were analyzed at least twice.

2.5. Physicochemical characterization of Promogran[®] samples loaded with jambu extract

Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy (FTIR-ATR) – Non-processed and SSI/SSD processed samples were analyzed by FTIR-ATR spectroscopy (128 scans, resolution 4 cm^{-1} , 600–4000 cm^{-1}) using a Golden Gate Single Reflection Diamond ATR accessory (Jasco, model 4200, UK). The jambu extract was also analyzed.

Surface morphology – Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of the samples were obtained using a JEOL microscope (model JSM-6610LV, Japan) at 10 kV and at different magnifications. Samples were coated with gold (300 \AA) using a Denton Vacuum (model Desk V, USA)

Porosity – The porosity of the samples was determined using Eq. (3):

$$\text{Porosity} = 1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{solid}}} \quad (3)$$

where ρ_{apparent} (kg m^{-3}) is the apparent density, calculated as the ratio between the mass and the volume of squared samples (1 \times 1 \times 0.2 cm), and ρ_{solid} (kg m^{-3}) is the real density measured by helium pycnometry (Accupyc 1330 Micrometrics, USA). Measurements were performed in triplicate.

Water vapor permeability (WVP) – The water vapor permeability of non-processed and SSI/SSD processed samples was calculated using Eq. (4):

$$\text{WVP} = \text{WVTR} \frac{l}{P_0(RH_{\text{in}} - RH_{\text{out}})} \quad (4)$$

where l is the sample thickness (m), P_0 is the water vapor pressure at 305 K, RH_{in} and RH_{out} are the relative humidity of the air inside the permeability cell and in the desiccator (20% using a saturated lithium chloride solution), respectively and WVTR ($\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$) is the water vapor transmission rate of the samples. WVTRs values were measured based on the ASTM E96-90D standard (2010), following a procedure previously described in the literature [3], which measures the water mass loss from the samples during a period of time (t) through an exposed vapor transmission area (A) of 0.636 cm^2 (according to Eq. (5)). Measurements were performed in duplicate.

$$\text{WVTR} = \frac{\text{water mass loss}}{t \times A} \quad (5)$$

Water contact angle – The hydrophobicity of the samples was

Table 1

Calculated scCO₂ absorbed amounts of scCO₂ into Promogran[®] (M₀), scCO₂ sorption degrees (S) and CO₂ desorption diffusion coefficients (D).

Time (h)	308 K				318 K			
	ρ CO ₂ (kg m ⁻³)/Pressure (MPa)	M ₀ (g)	S (%)	D × 10 ⁻⁸ (m ² s ⁻¹)	ρ CO ₂ (kg m ⁻³)/Pressure (MPa)	M ₀ (g)	S (%)	D × 10 ⁻⁸ (m ² s ⁻¹)
1	650/8.9	0.29 ± 0.01	94.72 ± 0.61	0.83 ± 0.10	650/11.9	0.20 ± 0.01	93.18 ± 0.64	1.00 ± 0.08
	750/11.3	0.22 ± 0.05	93.75 ± 0.49	1.03 ± 0.09	750/15.5	0.32 ± 0.01	92.96 ± 0.57	0.86 ± 0.22
	850/18.3	0.27 ± 0.01	94.82 ± 0.33	0.86 ± 0.13	850/24.1	0.28 ± 0.01	94.15 ± 0.77	0.71 ± 0.11
2	650/8.9	0.15 ± 0.00	92.43 ± 0.74	1.23 ± 0.27	650/11.9	0.60 ± 0.04	89.64 ± 0.19	0.49 ± 0.26
	750/11.3	0.20 ± 0.01	94.45 ± 0.11	0.96 ± 0.09	750/15.5	0.55 ± 0.07	89.90 ± 0.11	0.51 ± 0.15
	850/18.3	0.25 ± 0.04	94.23 ± 0.53	0.92 ± 0.02	850/24.1	0.49 ± 0.02	92.01 ± 0.02	0.65 ± 0.03
4	650/8.9	0.28 ± 0.02	93.07 ± 0.83	0.83 ± 0.06	650/11.9	0.25 ± 0.04	92.76 ± 0.96	0.95 ± 0.12
	750/11.3	0.33 ± 0.02	94.48 ± 0.60	0.81 ± 0.06	750/15.5	0.39 ± 0.01	90.67 ± 1.63	0.93 ± 0.03
	850/18.3	0.28 ± 0.01	94.77 ± 0.32	0.72 ± 0.05	850/24.1	0.46 ± 0.05	90.76 ± 0.52	0.67 ± 0.06
8	650/8.9	0.28 ± 0.05	92.94 ± 0.75	1.06 ± 0.29	650/11.9	0.21 ± 0.03	92.57 ± 0.62	1.01 ± 0.00
	750/11.3	0.27 ± 0.01	93.55 ± 0.97	0.85 ± 0.14	750/15.5	0.27 ± 0.00	93.40 ± 0.16	0.95 ± 0.03
	850/18.3	0.32 ± 0.03	94.42 ± 0.25	0.81 ± 0.02	850/24.1	0.23 ± 0.07	92.41 ± 1.14	1.12 ± 0.13
16	650/8.9	0.32 ± 0.01	93.80 ± 0.61	0.89 ± 0.01	650/11.9	0.32 ± 0.01	88.66 ± 0.30	1.02 ± 0.06
	750/11.3	0.17 ± 0.02	89.95 ± 0.64	1.45 ± 0.18	750/15.5	0.46 ± 0.00	90.72 ± 0.48	0.71 ± 0.03
	850/18.3	0.30 ± 0.05	92.22 ± 1.26	0.78 ± 0.05	850/24.1	0.63 ± 0.07	90.74 ± 0.99	0.38 ± 0.03
Average values	650/8.9	0.27 ± 0.07	93.39 ± 0.89	0.97 ± 0.17	650/8.9	0.32 ± 0.17	91.36 ± 2.06	0.89 ± 0.23
	750/11.3	0.24 ± 0.06	93.24 ± 1.88	1.02 ± 0.26	750/11.3	0.40 ± 0.11	91.53 ± 1.55	0.79 ± 0.18
	850/18.3	0.29 ± 0.02	94.09 ± 1.08	0.82 ± 0.08	850/18.3	0.42 ± 0.16	92.01 ± 1.41	0.71 ± 0.27

inferred based on water contact angle measurements which were performed using the sessile drop method and an OCA20 contact angle apparatus (Dataphysics Instruments GmbH, Germany). Reported results were averaged (5 measurements per sample).

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed by Analyses of variance (ANOVA) and comparison tests (*t* student). All the results obtained were represented as average ± standard deviation of measurements.

3. Results and discussion

An example of the gravimetric experiments used for the determination of scCO₂ absorbed amounts is presented in Fig. S1 (Supplementary material). The calculated scCO₂ absorbed amounts (M₀), scCO₂ sorption degrees (S, %) and the CO₂ desorption diffusion coefficients (D × 10⁻⁸, m² s⁻¹) are presented in Table 1. These values were estimated by fitting the experimental CO₂ desorption curves (for the initial 100 s) using an analytical solution of the simplified Fick's 2nd law equation (Eq. (1)). Since the obtained results (S and D) were very similar independently of the employed exposure time (Fig. S2, Supplementary materials), it is possible to assume that scCO₂ sorption equilibrium was reached for exposure times shorter than 1 h. Therefore, average equilibrium sorption degrees and CO₂ desorption diffusion coefficients are presented in Fig. 1 as a function of temperature and scCO₂ density (Fig. 1A and B, respectively).

In Fig. 1A, the results show that Promogran[®] presents scCO₂

equilibrium sorption degrees higher than 90% for all the tested conditions. These equilibrium sorption degrees were not statistically different at the same temperature (for all scCO₂ densities), but they were statistically significant (*p* < 0.05) when comparing the same scCO₂ densities at different temperatures (308 and 318 K). In fact, a small decrease in scCO₂ sorption degrees (~2.0%, Fig. 1A) was observed when the temperature increased. The high scCO₂ sorption degree measured for the Promogran[®] samples may be attributed to its high porosity, ~95%, as calculated by Eq. (3), which enhances scCO₂ loading and diffusion through the polymer structure.

According to Fig. 1B, CO₂ desorption diffusion coefficients were almost constant, ~1.0 × 10⁻⁸ m² s⁻¹, over the entire range of experimental conditions studied and the results did not show a significant difference (*p* > 0.05) for all tested conditions.

The experimental conditions applied for the SSI/SSD of jambu extracts in Promogran[®] were selected based on the obtained sorption results. As previously referred, only small differences were identified among all the tested experimental conditions and that the highest equilibrium sorption degrees were attained at the lowest temperature (308 K), independently of the scCO₂ density, and after 1 h of scCO₂-polymer exposure time. Therefore, the SSI/SSD experiments were performed at this temperature since it seems to favor scCO₂ sorption and it also allows working at lower temperatures, thus avoiding the risks of thermal degradation of the compounds present in the jambu extract and of collagen present in Promogran[®]. The thermal denaturation of collagen present in Promogran[®] was previously reported to occur around 323 K [41].

Although no significant effect of the scCO₂ density over the scCO₂

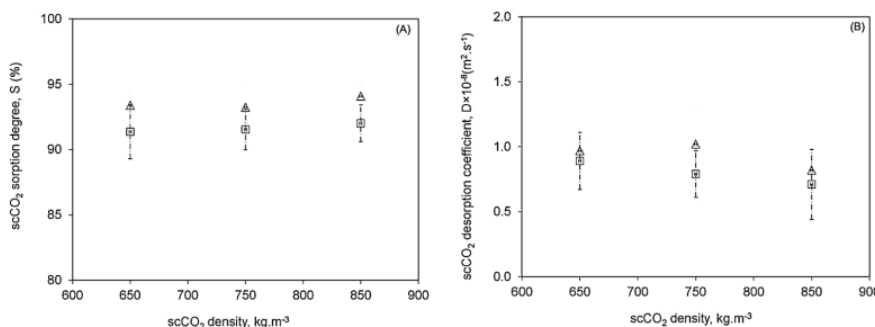


Fig. 1. Effect of scCO₂ density and temperature on the scCO₂-equilibrium sorption degree (A) and on CO₂ desorption diffusion coefficients (B). Symbols represent the employed temperatures: (Δ) 308 K and (□) 318 K.

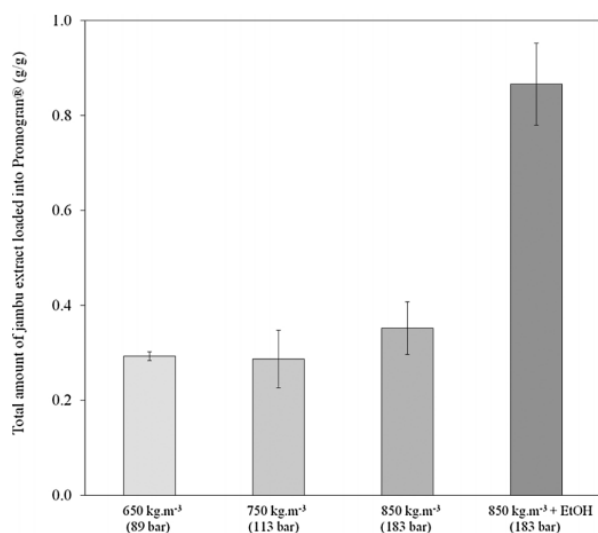


Fig. 2. Effect of scCO₂ density and of ethanol addition (5% molar) on the total amounts of jambu extract loaded into Promogran* (at 308 K).

sorption degrees (at constant temperature) was observed it is known that the solvent density may significantly affect the solubility of substances in scCO₂ and consequently the SSI/SSD loading yields. Therefore, in this work the SSI/SSD experiments were performed at 308 K and at the same scCO₂ densities, 650 kg m⁻³ (89 bar), 750 kg m⁻³ (113 bar) and 850 kg m⁻³ (183 bar) that were used for the sorption experiments. As discussed before, the equilibrium sorption degrees of scCO₂ into the samples was achieved at lower contact periods but higher SSI/SSD processing periods (4 h) were employed to assure the complete dissolution of the extract in scCO₂ and its diffusion into Promogran*. The total amounts of jambu extract loaded under those SSI/SSD experimental conditions are presented in Fig. 2 and in Table 2. As referred in section 2.3 it should be noticed that the total amount of loaded extracts was assumed to be equal to the amount of extracts leached by n-hexane. It can be observed that, when using only scCO₂ as a carrier solvent, the amount of extract loaded at 850 kg m⁻³ (~0.35 ± 0.05w/w) was slightly higher than that obtained at lower densities (~0.29 ± 0.06 at 650 kg m⁻³ and ~0.29 ± 0.05 at 750 kg m⁻³) where no statistical difference (p > 0.05) was observed. These results indicate that the solubility of the extract in scCO₂, as well as the affinities of the jambu extract components towards Promogran*, may also be playing important roles in the overall SSI/SSD process efficiency. To the best of our knowledge, there is no available data on the overall solubility of the jambu extract in scCO₂ under the experimental conditions used in the present work. Nevertheless, the indirect solubilities of jambu extracts in scCO₂ (inferred from scCO₂ extraction yields) were previously reported to increase with asCO₂ density at 323 K [35].

The effect of the co-solvent (ethanol) in the extract loading yields

was also studied at 308 K and 850 kg m⁻³ since this was the experimental condition that originated the highest extract loading yield when using only scCO₂ as the carrier solvent. As it can be seen in Fig. 2 and Table 2, the presence of the co-solvent at 5% (molar) increased the extract loading yield ~2.5 times. This increase is typical of the enhanced effects of polar (or slightly polar) co-solvents on the solubility of polar extracts in scCO₂ as referred above. Although measured at different experimental conditions (323 K, 25 MPa and 30/70 v/v% in scCO₂/ethanol), the indirect solubility of jambu flowers extract (inferred from extraction yields) was found to increase when using a mixture of scCO₂ + EtOH as solvent [42]. Nevertheless, other specific interactions that may occur between all the involved components of the system, namely the scCO₂/polymer matrix/co-solvent interactions and extract/polymer matrix/co-solvent, should not be neglected and may all contribute to the observed increase in the loading yield.

The GC–MS chromatographic profiles of the released/leached extracts are presented in Fig. 3. The profile of original jambu extract is also shown for comparison. As it can be seen, quite similar profiles were obtained for all tested SSI/SSD conditions, which indicates that the great majority of substances present in the original extract were loaded into Promogran* samples, regardless the differently employed SSI/SSD experimental conditions. The peak detected at approximately 29 min corresponds to spilanthol, as confirmed by the chromatogram of the standard that was obtained in a previous work [35] (Fig. S3 in Supplementary material). The amount of spilanthol present in the extracts loaded/released from Promogran* samples was quantified and the results are also presented in Table 2. It can be seen that the amount of spilanthol present in the loaded/released extracts increases with scCO₂ solvent density is further enhanced with the use of co-solvent. As a consequence, higher amounts of spilanthol (~ 10 times higher) can be loaded/released into Promogran* samples when using ethanol (5% molar) as co-solvent (Table 2). Overall these results show that it is possible to tune the amount and the relative composition of the jambu extracts loaded into Promogran* samples by changing SSI/SSD processing conditions, which is a major advantage of this process. Finally, several fatty acids were also identified in loaded/released jambu extracts by GC–MS (with a confidence level higher than 95%), such as palmitic acid (31.75 min), linoleic acid (35.38 min), oleic acid (35.60 min) and stearic acid (36.22 min). The presence of these fatty acids in the extract can also be beneficial since these compounds have proved efficiency in wound healing management, namely linoleic acid [3,43,44]. Additionally, it was also reported that fatty acids [45] and spilanthol [46–48] can work as permeation enhancers that will facilitate the diffusion of other APIs through the skin.

The impregnation/deposition of the jambu extracts into Promogran* samples was further confirmed by FTIR-ATR and by SEM (Figs. 4 and 5, respectively). Fig. 4 shows that Promogran* presents characteristic peaks in the 3200–3500 cm⁻¹ range, which can be attributed to the presence of hydroxyl and amine/amide stretching vibration modes from cellulose and collagen, respectively [49]. The carboxylic and amino groups of collagen are responsible for peaks between 1500 and 1700 cm⁻¹ [50,51]. As can be seen in Fig. 4, the FTIR spectra of the

Table 2

SSI/SSD loaded amounts of jambu flowers extract and of spilanthol into Promogran* at 308 K; water contact angles; water vapor transmission rates (WVTR) and water vapor permeabilities (WVP) of loaded and non-loaded Promogran* samples.

Solvents	ρ scCO ₂ (kg m ⁻³)	Extract loaded into Promogran* (% wt)	Spilanthol/Released extract (μg/mg)	Spilanthol/Promogran* (mg/g)	Water contact angle (°)	WVTR (g m ⁻² d ⁻¹)	WVP (kg (s.m Pa) ⁻¹ × 10 ⁻¹⁴)
scCO ₂	650	0.293 ± 0.01 (2.4%)	34,8 ± 9,6	6,7 ± 1,9	112,0 ± 5,9	1923,9 ± 160,0	11,9 ± 1,0
	750	0.287 ± 0.06 (2.2%)	40,7 ± 5,7	6,2 ± 0,9	113,7 ± 3,4	1867,3 ± 26,7	11,5 ± 0,2
	850	0.352 ± 0.05 (2.9%)	45,7 ± 8,8	6,3 ± 1,2	123,8 ± 2,3	1942,8 ± 26,7	12,0 ± 0,2
scCO ₂ + EtOH	850	0.866 ± 0.09 (6.4%)	89,4 ± 0,5	62,3 ± 0,4	128,4 ± 4,5	2018,2 ± 80,0	12,5 ± 0,5
Control	–	–	–	–	103,3 ± 2,9	1999,3 ± 106,7	12,3 ± 0,7

Control = Non-processed Promogran* sample.

C.V. da Silva et al.

The Journal of Supercritical Fluids 133 (2018) 503–511

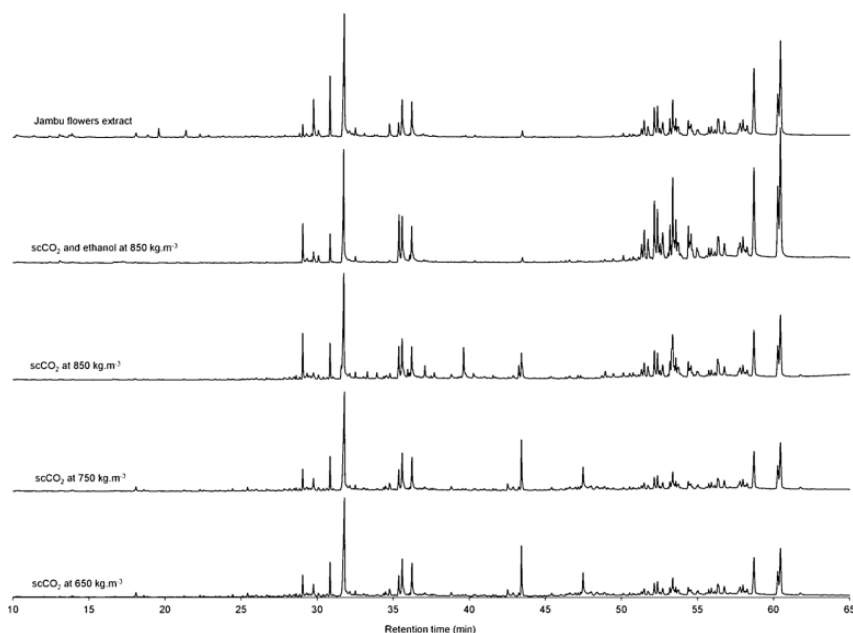


Fig. 3. GC-MS chromatograms of jambu flowers extracts released/leached from Promogran[®] samples after SSI/SSD at different experimental conditions. The chromatogram of the original jambu extract is also represented for comparison.

loaded samples also present specific peaks that are characteristic of the pure extract (also represented in Fig. 4 for comparison purposes), namely at 2850–2920 cm⁻¹, which can be assigned to CH₂ and CH₃ stretching; and at 1700 cm⁻¹ which can be attributed to C=O stretching [52,53]. These results also confirm the presence of fatty acids in the extract (as already identified by GC-MS data). Furthermore, and although this analysis is not quantitative, it can be observed that the intensity of the characteristic peaks of the extract seems to increase with the total amounts of loaded extracts. SEM micrographs (Fig. 5) shows that the SSI/SSD process did not affect the morphology of Promogran[®] since any clear differences can be observed when comparing non-processed and SSI/SSD processed samples (with and without co-solvent). Moreover Fig. 5 (zoomed micrographs) also confirms the deposition of thin layers of the jambu extract onto the surfaces of the Promogran[®] matrix as previously reported after the impregnation of Copaiba oil [41] and jucá (*Libidibia ferrea*) extract [3] in natural-based wound dressings. As other preliminary assays, Promogran[®] samples were immersed in solvents such as ethanol, *n*-hexane and water which are solvents often used to load APIs into polymers by the immersion method. This was performed for a 4 h soaking period (same time used

for the scCO₂ impregnation/deposition). It was observed that solvents commonly used in pharmaceutical applications such as water and ethanol deform (shrink) the original foamed structure of Promogran[®] after drying (supplementary material, S4). These results represent a further advantage of using scCO₂ as a carrier solvent to load bioactive compounds/extracts into biopolymers which may deform and lose their original porous structures when in contact with conventional organic carrier solvents. Samples immersed in *n*-hexane seem to maintain the original porous structure and dimensions. However *n*-hexane is an EMA/ICH/FDA Class II solvent and therefore the presence of residual impurities in pharmaceutical and healthcare related materials is limited (290 ppm) [54].

Besides protecting the wounds from microorganisms and/or external aggressions, wound dressings should also be able to control wound fluid exchanges (exudates, water vapor, gases, etc) between the wound site and the environment and in order to maintain proper moisture conditions that enhance the wound-repairing process [55]. Therefore, the selection of the proper wound dressing for a given wound will depend on the materials' hydrophilicity and permeability for gases (including water vapor). The former will affect materials'

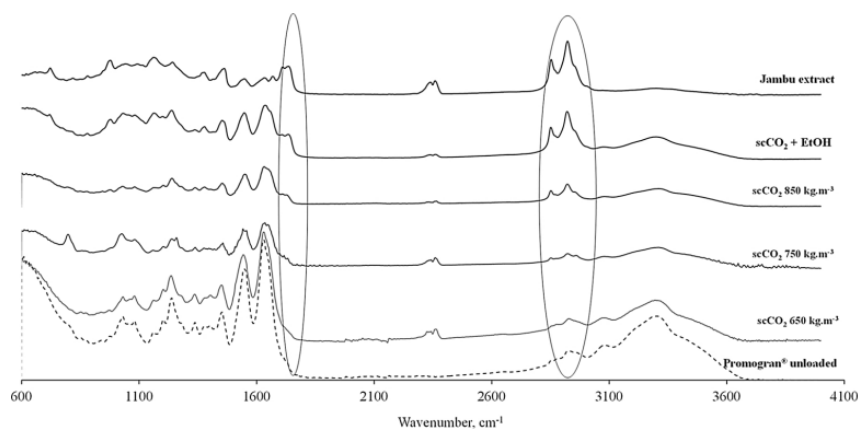


Fig. 4. FTIR-ATR spectra of non-loaded and of SSI/SSD loaded Promogran[®] samples. The spectra of the pure extract and of non-loaded Promogran[®] are also represented for comparison.

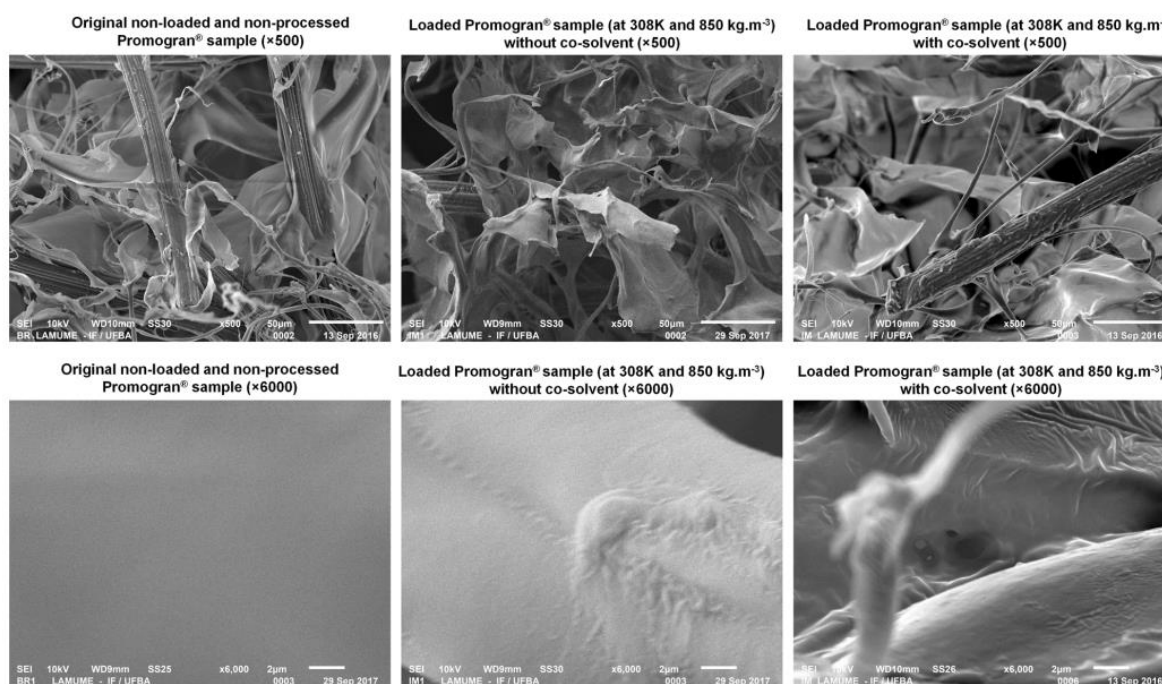


Fig. 5. Scanning electron microscopy (SEM) of original (non-loaded and non-processed) and of SSI/SSD loaded Promogran® samples (at 308 K and 850 kg m⁻³).

adhesion properties and exudate removal capacity as well as it will enhance cell migration, proliferation and extracellular matrix deposition during the wound healing stages [56,57]; while the latter is essential to ensure a proper healing environment, since injured skin may lose up to 200 g m⁻² h⁻¹ of water, which is 20 times higher than that of healthy skin ~10 g m⁻² h⁻¹ [55–59].

The effects of loading jambu extracts on the hydrophobicity and water vapor permeability of Promogran® are shown in Table 2. Based on water contact angle results it was possible to conclude that Promogran® has an hydrophobic character (water contact angle > 90°, probably due to the intrinsic hydrophobicity of collagen type I that is present in its matrix), which was increased by the loading/deposition of the jambu extract, which suggests that this extract is hydrophobic (as expected due to its solubility in scCO₂). As shown in Table 2, the hydrophobicity of Promogran® increases with the amount of jambu that was loaded into and on the surface of the wound dressing. These results were statistically significant ($p < 0.05$). The values obtained for WVTR and WVP, measured for non-loaded and for extract loaded Promogran® samples were not statistically different ($p > 0.05$), which indicates that the presence of the extract did not affect the original capacity of the wound dressing to regulate water vapor exchanges between the wound and the exterior. Averaged values of $1950 \pm 60.5 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and $(12 \pm 0.4) \times 10^{-14} \text{ kg (s.m Pa)}^{-1}$ were obtained for WVTR and WVP, respectively (Table 2). The WVTR values obtained in this work are close to those recommended in the literature for most wound dressings intended for burn treatments ($2000\text{--}2500 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) [55,56,58,59] and as optimal values for other general injuries ($2028.3 \pm 237.8 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) [60].

4. Conclusion

In the present work, spilanthol-enriched jambu extracts were loaded into Promogran® wound dressings using a SSI/SSD methodology and experimental conditions based on previous scCO₂ sorption measurements. The obtained results showed that the equilibrium amounts of scCO₂ that were absorbed/adsorbed by the Promogran® matrix were

only slightly dependent of the experimental temperature (decreases by 2% with temperature) and were independent of the solvent density (for the density range studied in this work) and of the tested scCO₂-polymer exposure times (from 1 up to 16 h). High scCO₂ sorption capacities (> 89%) were obtained at all the experimental conditions tested. At the lowest temperature (to avoid extract/biopolymer degradation) and highest sorption degree (~95%, 308 K, 850 kg m⁻³), the amount of jambu extract that was impregnated/deposited into Promogran® wound dressings was slightly higher (~0.30–0.41 g/g) than that obtained under the other studied conditions. This occurred most probably because the total loading amount depends not only on the scCO₂/matrix interactions but also on scCO₂/extract and extract/matrix interactions, which should be favored at higher solvent density. The total amount of extract (0.78–0.95 g/g) that were loaded when using a small amount (5% molar) of ethanol as co-solvent increased approximately 2.5 times when compared to the same experimental conditions using only scCO₂ as the carrier solvent. As a consequence the use of co-solvent also enhances the amount of spilanthol loaded/released into Promogran® samples (~10 times higher than when using pure scCO₂). These results demonstrate the feasibility of integrating supercritical fluid extraction (SFE) and SSI/SSD processes to obtain bioactive natural-origin wound dressings using polymers obtained from renewable resources (biopolymers) and greener solvents and processes. The combination of natural-origin bioactive substances, presenting proven anesthetic/analgesic and anti-inflammatory activities, and natural-origin polymers represents promising and greener approaches to fulfil most of the typical requirements needed for the next generation of bioactive wound dressings.

Acknowledgements

This work was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) under contract FCT/CAPES355/2013, by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT-MEC) under contracts PTDC/SAU-BEB/71395/2006, PTDC/SAU-FAR/

121109/2010 and PEst-C/EQB/UI0102/2013 (Portugal). M.E.M. Braga and A.M.A. Dias acknowledge FCT-MEC for fellowships SFRH/BPD/101048/2014 and FCT IF/00455/2013, respectively. Authors gratefully acknowledge Systagenix (currently Acclivity, USA) who kindly supplied the Promogran[®] wound dressings that were used in this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.028>.

References

- [1] L.J. Borda, F.E. Macquhrie, R.S. Kirsner, Wound dressings: a comprehensive review, *Curr. Derm. Rep.* 5 (2016) 287–298.
- [2] J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N.E. Stevens, G.M. Eccleston, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2892–2923.
- [3] A.M.A. Dias, A. Rey-Rico, R.A. Oliveira, S. Marceneiro, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, R.N.C. Júnior, M.E.M. Braga, H.C. Sousa, Wound dressings loaded with an anti-inflammatory júcá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology, *J. Supercrit. Fluids* 74 (2013) 34–45.
- [4] J. Sawynok, Topical and peripherally acting analgesics, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 1–20.
- [5] L.T. Yamane, E. Paula, M.P. Jorge, V.S. Freitas-Blanco, I. Montanari Junior, G.M. Figueira, L.A. Anholetto, P.R. Oliveira, R.A.F. Rodrigues, *Acmella oleracea* and *Achyrocline satureioides* as sources of natural products in topical wound care, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* (2016) (Article ID 3606820).
- [6] E. Khor, L.F. Tay, K.S. Goht, C.N. Lee, Prevention of prosthetic valve endocarditis by impregnation of gentamicin into surgical pledgets, *Biomaterials* 17 (1996) 1631–1637.
- [7] K. Saleh, A. Sonesson, K. Persson, K. Riesbeck, A. Schmidtchen, Can dressings soaked with polyhexanide reduce bacterial loads in full-thickness skin grafting? A randomized controlled trial, *J. Am. Acad. Dermatol.* 75 (2016) 1221–1228.
- [8] S.K. Niazi (Ed.), *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*, 2nd ed., CRC Press, 2009.
- [9] J. Swarbrick (Ed.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3rd ed., CRC Press, 2006.
- [10] J.E. Edmonds, Wound dressings comprising a carboxymethyl cellulose fabric impregnated with honey, Patent WO 02/087644 A1, 2002.
- [11] R. Subrahmanyam, P. Gurikov, J.M. Meissner, I. Smirnova, Preparation of biopolymer aerogels using green solvents, *J. Vis. Exp.* 113 (2016) 54116–54221.
- [12] X. Shen, J.L. Shamshina, P. Berton, G. Gurau, R.D. Rogers, Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties, and applications, *Green Chem.* 18 (2016) 53–75.
- [13] S. Chung, C. Gentilini, A. Callanan, M. Hedegaard, S. Hassing, M.M. Stevens, Responsive poly (g-glutamic acid) fibres for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 1397–1401.
- [14] I. Kikić, F. Vecchione, Supercritical impregnation of polymers, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 7 (2003) 399–405.
- [15] M.E.M. Braga, M.T.V. Pato, H.S.R.C. Silva, E.I. Ferreira, M.H. Gil, C.M.M. Duarte, H.C. de Sousa, Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives, *J. Supercrit. Fluids* 44 (2008) 245–257.
- [16] A. López-Periago, A. Argemí, J.M. Andanson, V. Fernández, C.A. García-González, S.G. Kazarian, J. Saurina, C. Domingo, Impregnation of a biocompatible polymer aided by supercritical CO₂: evaluation of drug stability and drug-matrix interactions, *J. Supercrit. Fluids* 48 (2009) 56–63.
- [17] L.I. Cabezas, V. Fernández, R. Mazarro, I. Gracia, A. de Lucas, J.F. Rodríguez, Production of biodegradable porous scaffolds impregnated with indomethacin in supercritical CO₂, *J. Supercrit. Fluids* 63 (2012) 155–160.
- [18] A. Salerno, C.D. Pascual, Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering, *Process Biochem.* 50 (2015) 826–838.
- [19] M. Champeau, J.-M. Thomassin, T. Tassaing, C. Jérôme, Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: a review, *J. Control. Release* 209 (2015) 248–259.
- [20] A. Bouledjoudja, Y. Masmoudi, M. Sergent, V. Trivedic, A. Meniai, E. Badens, Drug loading of foldable commercial intraocular lenses using supercritical impregnation, *Int. J. Pharm.* 500 (2016) 85–99.
- [21] A. Bernhardt, M. Wehr, B. Paul, T. Hochmuth, M. Schumacher, K. Schütz, M. Gelinsky, Improved sterilization of sensitive biomaterials with supercritical carbon dioxide at low temperature, *PLoS One* 10 (2015) 1–19.
- [22] V. Herdegen, A. Felix, R. Haseneder, J.U. Repke, K. Leppchen-Fröhlich, I. Prade, M. Meyer, Sterilization of medical products from collagen by means of supercritical CO₂, *Chem. Eng. Technol.* 37 (2014) 1891–1895.
- [23] M. Perrut, Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review), *J. Supercrit. Fluids* 66 (2012) 359–371.
- [24] J.R. Bush, A. Akgerman, K.R. Hall, Synthesis of controlled release device with supercritical CO₂ and co-solvent, *J. Supercrit. Fluids* 41 (2007) 311–316.
- [25] M.V. Natu, M.H. Gil, H.C. de Sousa, Supercritical solvent impregnation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(oxyethylene-*b*-oxypropylene-*b*-oxyethylene) and poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2008) 93–102.
- [26] A.C.K. Bierhalz, M.A. Silva, M.E.M. Braga, H.C. Sousa, T.G. Kieckbusch, Effect of calcium and/or barium crosslinking on the physical and antimicrobial properties of natamycin-loaded alginate films, *LWT Food Sci. Technol.* 57 (2014) 494–501.
- [27] M. Champeau, J.-M. Thomassin, T. Tassaing, C. Jérôme, Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: a review, *J. Control. Release* 209 (2015) 248–259.
- [28] J. Sanchez-Sanchez, M.T. Fernández-Ponce, L. Casas, C. Mantell, E.J. Martínez de la Ossa, Impregnation of mango leaf extract into a polyester textile using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 128 (2017) 208–217.
- [29] M.L. Goñi, N.A. Ganán, M.C. Strumiac, R.E. Martini, Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation, *J. Supercrit. Fluids* 111 (2016) 28–35.
- [30] J. Ivanovic, S. Knauer, S.A. Fanovich, S. Milovanovic, M. Stamenic, M.P. Jaeger, I. Zizovic, R. Eggers, Supercritical CO₂ sorption kinetics and thymol impregnation of PCL and PCL-HA, *J. Supercrit. Fluids* 107 (2016) 486–498.
- [31] V.P. Costa, M.E.M. Braga, J.P. Guerra, A.R.C. Duarte, E.O.B. Leite, C.M.M. Duarte, M.H. Gil, H.C. de Sousa, Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method, *J. Supercrit. Fluids* 52 (2010) 306–316.
- [32] A.M.A. Dias, M.E.M. Braga, I.J. Seabra, P. Ferreira, M.H. Gil, H.C. de Sousa, Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide, *Int. J. Pharm.* 408 (2011) 9–19.
- [33] M.E.M. Braga, V.P. Costa, M.J.T. Pereira, P.T. Fiadeiro, A.P.A.R. Gomes, C.M.M. Duarte, H.C. de Sousa, Effects of operational conditions on the supercritical solvent impregnation of acetazolamide in balafilcon a commercial contact lenses, *Int. J. Pharm.* 420 (2011) 231–243.
- [34] A.F. Barbosa, M.G. Carvalho, R.E. Smith, A.U.O. Sabaa-Srur, Spilanthal: occurrence, extraction, chemistry and biological activities, *Braz. J. Pharmacog.* 26 (2016) 128–133.
- [35] A.M.A. Dias, A.C.S. Silva, J.R.S. Botelho, R.N.C. Júnior, H.C. Sousa, M.E.M. Braga, Temperature and density effects of the scCO₂ extraction of spilanthal from *Spilanthes acmella* flowers, *J. Supercrit. Fluids* 121 (2017) 32–40.
- [36] A.R. Berens, G.S. Huvard, R.W. Kormeyer, F.W. Kunig, Application of compressed carbon dioxide in the incorporation of additives into polymers, *J. Appl. Polym. Sci.* 46 (1992) 231–242.
- [37] C.V. Silva, V.J. Pereira, P.T.V. Rosa, E.C.M. Cabral-Albuquerque, S.A.B. Vieira de Melo, G.M.N. Costa, A.M.A. Dias, H.C. Sousa, M.E.M. Braga, Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing, *J. Supercrit. Fluids* 115 (2016) 1–9.
- [38] D.R.C. Pascoal, E.C.M. Cabral-Albuquerque, E.S. Vellozo, H.C. de Sousa, S.A.B. Vieira de Melo, M.E.M. Braga, Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: a potential alternative topical anti leishmanial treatment, *J. Supercrit. Fluids* 129 (2017) 106–115.
- [39] A.M.A. Dias, P. Santos, I.J. Seabra, R.N.C. Júnior, M.E.M. Braga, Sousa Spilanthal from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction, *J. Supercrit. Fluids* 61 (2012) 62–70.
- [40] V.S. Freitas-Blanco, M. Franz-Montan, F.C. Groppo, J.E. de Carvalho, G.M. Figueira, L. Serpe, I.M.O. Sousa, V.A.G. Damasio, L.T. Yamane, E. Paula, R.A.F. Rodrigues, Development and evaluation of a novel mucoadhesive film containing *Acmella oleracea* extract for oral mucosa topical anesthesia, *PLoS One* 11 (2016) e0162850.
- [41] N. Gupta, A.R. Patel, R.P. Ravindra, Design of akalkara (*Spilanthes acmella*) formulations for antimicrobial and topical anti-inflammatory activities, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 3 (2012) 161–170.
- [42] P. Bonner, A.D. Marzano, C. Kaminski, K.A. Reynertson, Topical compositions comprising *Acmella oleracea* extracts and uses thereof. Patent US9522168, 2016.
- [43] C.R.B. Cardoso, M.A. Souza, E.A.V. Ferro, S. Favoreto Jr., J.D.O. Pena, Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds, *Wound Repair Regen.* 12 (2004) 235–243.
- [44] R. Kapoor, Y.S. Huang, Gamma linolenic acid: an anti-inflammatory omega-6 fatty acid, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7 (2006) 1–4.
- [45] G.R. Nanayakkara, A. Bartlett, B. Forbes, C. Marriott, P.J. Whitfield, M.B. Brown, The effect of unsaturated fatty acids in benzyl alcohol on the percutaneous permeation of three model penetrants, *Int. J. Pharm.* 301 (2005) 129–139.
- [46] J. Boonen, B. Baert, N. Roche, C. Burvenich, B. De Spiegeleer, Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthal (affinin) from *Spilanthes acmella* (*Compositae*) extracts, *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 77–84.
- [47] J. Boonen, B. Baert, C. Burvenich, P. Blondeel, S. De Saeger, B. De Spiegeleer, LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthal, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 243–249.
- [48] B. De Spiegeleer, J. Boonen, S.V. Malysheva, J.D. Di Mavungu, S. De Saeger, N. Roche, P. Blondeel, L. Taevernier, L. Vervyser, Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthal, *J. Ethnopharmacol.* 148 (2013) 117–125.
- [49] E. Suesca, A.M.A. Dias, M.E.M. Braga, H.C. de Sousa, M.R. Fontanilla, Multifactor analysis on the effect of collagen concentration cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, morphological, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* 77 (2017) 333–341.
- [50] W. Liu, Z. Tian, C. Li, G. Li, Thermal denaturation of fish collagen in solution: a calorimetric and kinetic analysis, *Thermochim. Acta* 581 (2014) 32–40.
- [51] D. Pellegrini, M. Corsi, M. Bonanni, R. Bianchini, A. D'Ulivo, E. Bramanti, Study of the interaction between collagen and naturalized and commercial dyes by fourier transform infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis, *Dyes Pigm.* 116 (2015) 65–73.
- [52] N. Nakatani, M. Nagashima, Pungent alkalimides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* clarke, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992) 759–762.
- [53] T.S. Preetha, S.N. Mohan, P.M. Najeeba, S.R. Deepthi, Chemical fingerprinting of

- Spilanthes acmella* L. (Murr.) – an acutely threatened medicinal plant of pharmaceutical importance by HPTLC, FTIR AND UV–vis spectroscopic tools, *World J. Pharm. Sci.* 12 (2014) 1275–1287.
- [54] European Medicines Agency, 2016, ICH guideline Q3C (R6) on impurities: guideline for residual solvents, Committee for Human Medicinal Products.
- [55] H. Xu, L. Ma, H. Shi, C. Gao, C. Han, Chitosan-hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: in vitro and in vivo studies, *Polym. Adv. Technol.* 18 (2007) 869–875.
- [56] A. Nangia, C.T. Hung, Design of a new hydrocolloid dressing, *Burns* 15 (1989) 385–388.
- [57] L. Moura, A.M.A. Dias, E. Carvalho, H.C. de Sousa, Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment – a review, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7093–7114.
- [58] D. Queen, J.D.S. Gaylor, J.H. Ebans, J.M. Courtney, W.H. Reid, The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressing, *Biomaterials* 8 (1987) 367–371.
- [59] Y.B. Wu, S.H. Yu, F.L. Mi, C.W. Wu, S.S. Shyu, C.K. Peng, A.C. Chao, Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends, *Carbohydr. Polym.* 57 (2004) 435–440.
- [60] R. Xu, H. Xia, W. He, Z. Li, J. Zhao, B. Liu, Y. Wang, Q. Lei, Y. Kong, Y. Bai, Z. Yao, R. Yan, H. Li, R. Zhan, S. Yang, G. Luo, J. Wu, Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24596–24607.

Supplementary Material**Supercritical solvent impregnation/deposition of spilanthol-enriched extracts into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing**

C.V. da Silva¹, V.J. Pereira¹, G.M.N. Costa¹, E.C.M. Cabral-Albuquerque¹, S.A.B. Vieira de Melo^{1,*},
H.C. de Sousa², A.M.A. Dias^{2,*}, M.E.M. Braga^{2,*}

¹ Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Rua Aristides Novis, 2, Federação, 40210-630,
Salvador, Bahia, Brazil

² CIEPQPF, Chemical Engineering Department, FCTUC, University of Coimbra, Rua Sílvio Lima,
Pólo II -Pinhal de Marrocos, 3030-790 Coimbra, Portugal

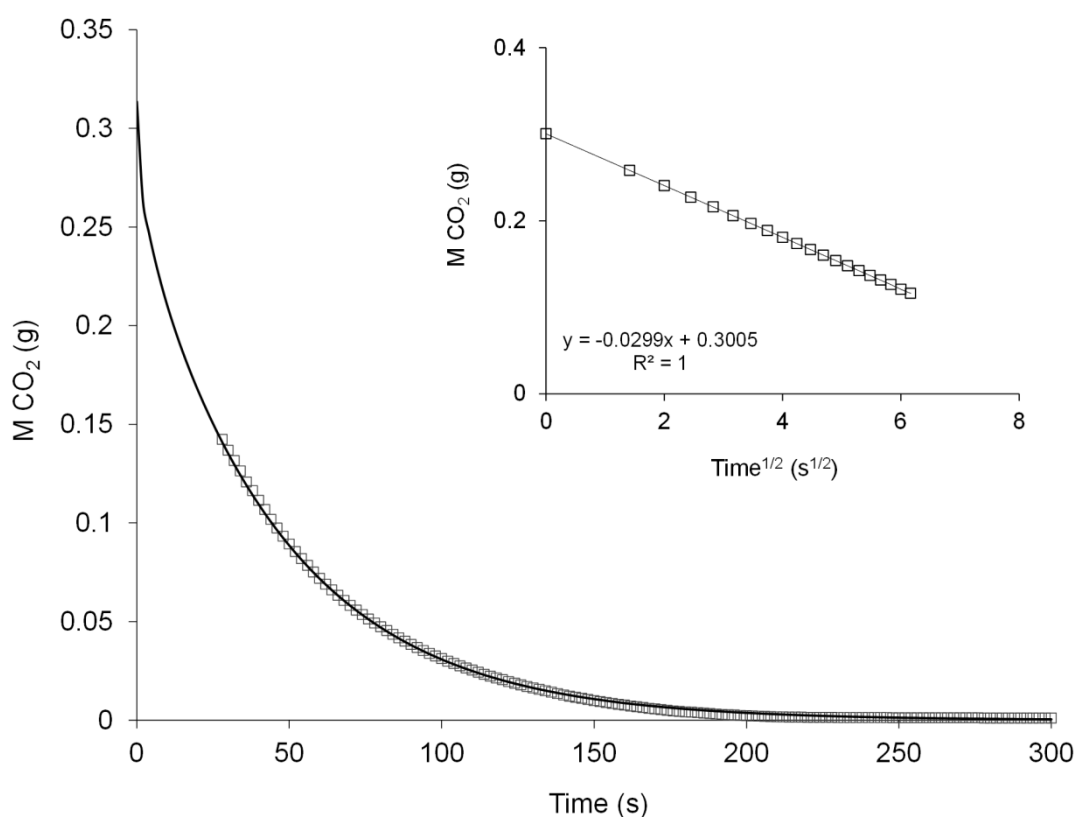


Figure S1. Desorption curve of carbon dioxide from Promogran[®] after an exposure time of 8 h at 308 K and scCO₂ density of 650 kg.m⁻³ (89 MPa). Symbols represent the experimental points and the line represents modeling results obtained for the analytical solution of Fick's second law using equation 1.

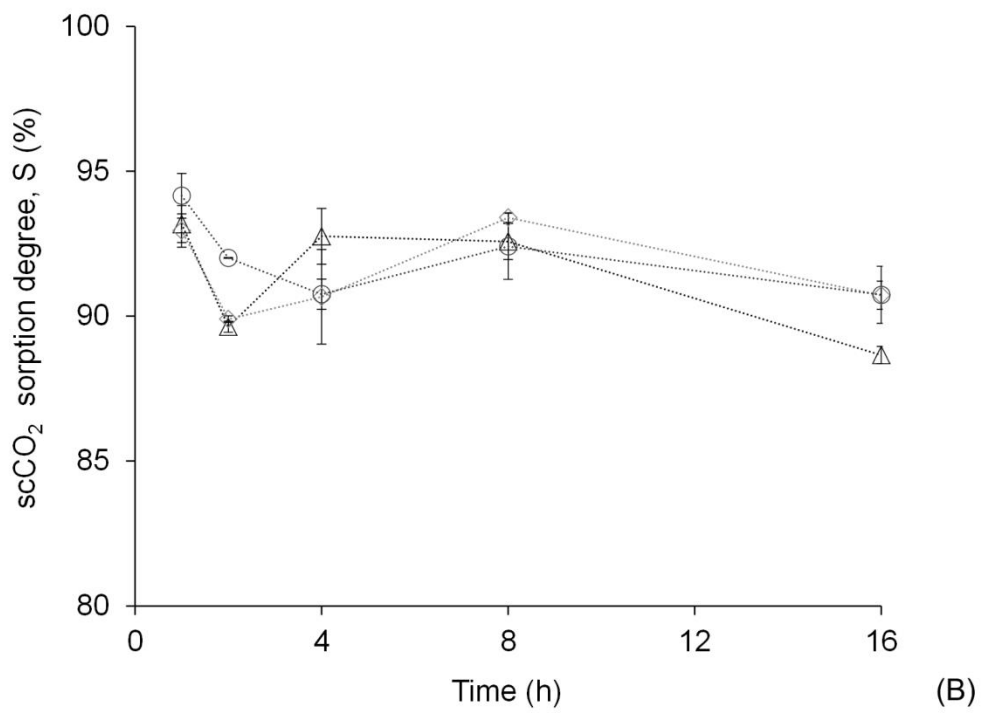
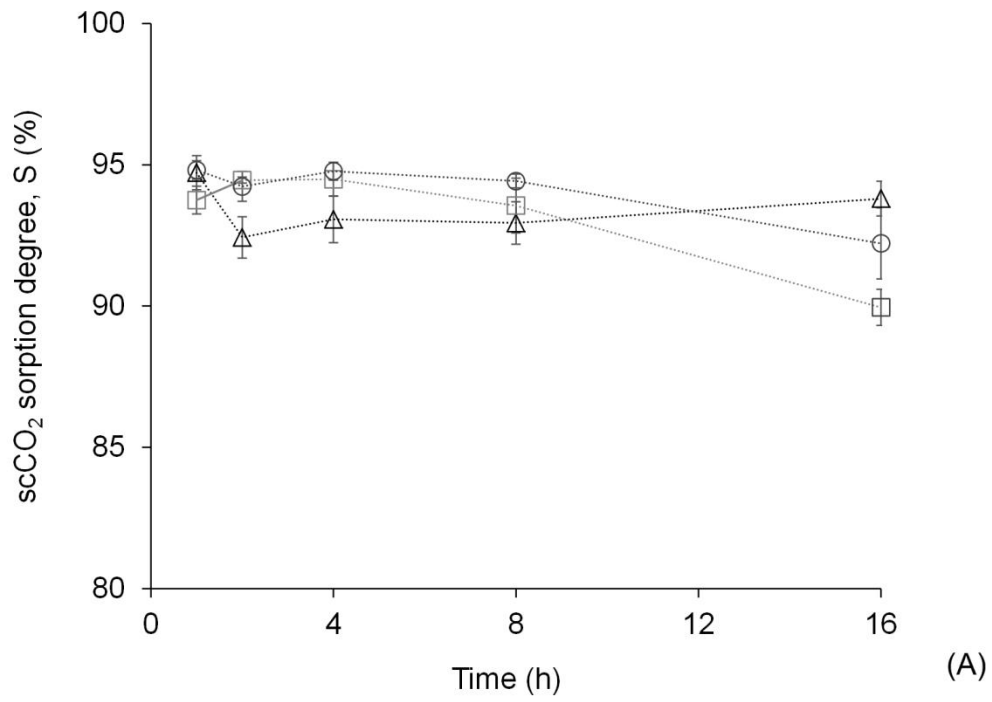


Figure S2. Sorption degree of scCO_2 in Promogran[®] samples vs. time (h) at 308 K (A) and 318 K (B). Symbols represent the solvent densities: (Δ) $650 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, (\square) $750 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ and (\circ) $850 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

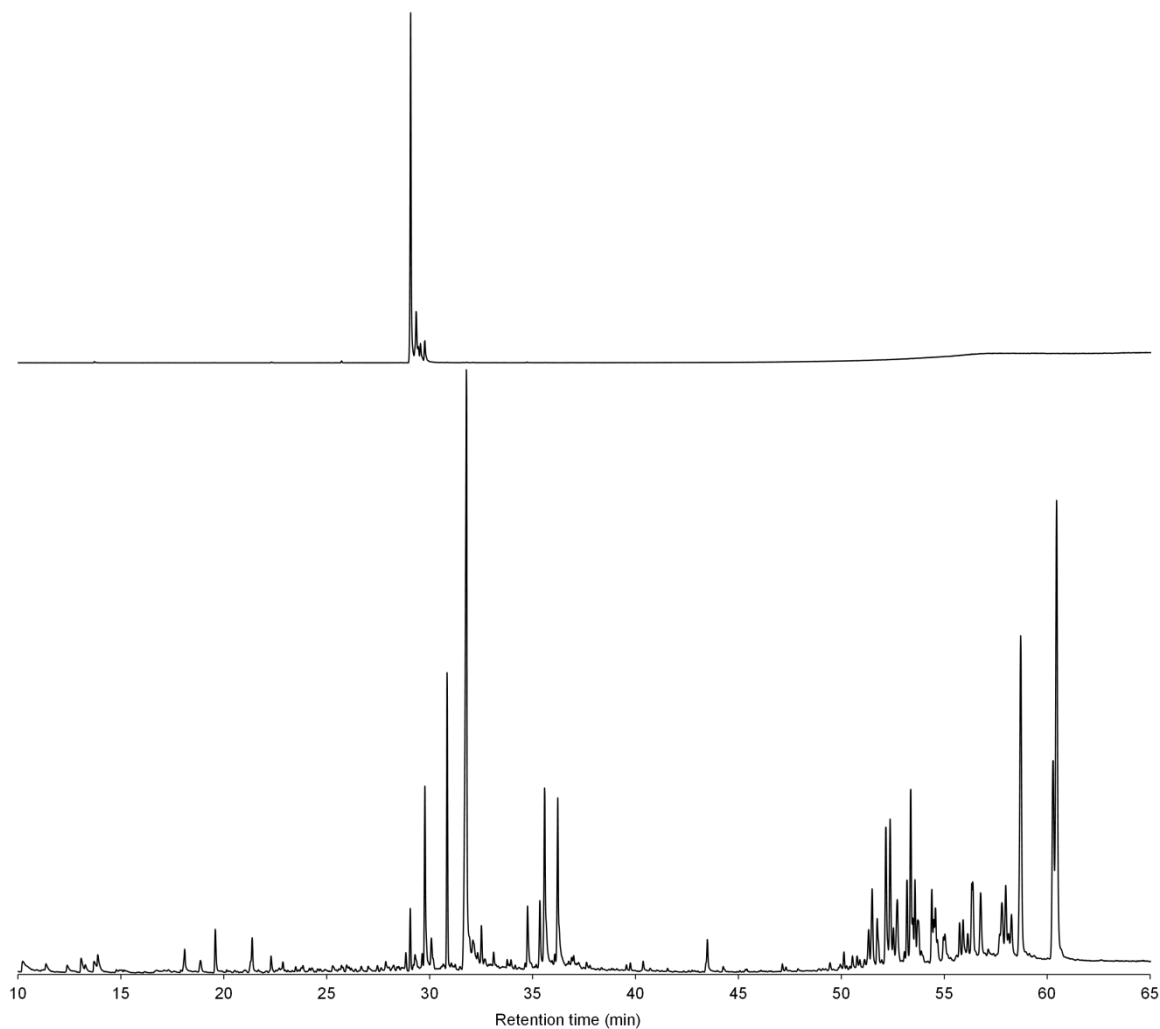


Figure S3. GC-MS chromatograms of spilanthal standard (top) and jambu flowers extract (bottom). Results confirm the presence of spilanthal (eluted at 29 minutes). The spilanthal standard and the jambu extract were both obtained following the experimental procedures reported in a previous work (Dias et al. 2017).

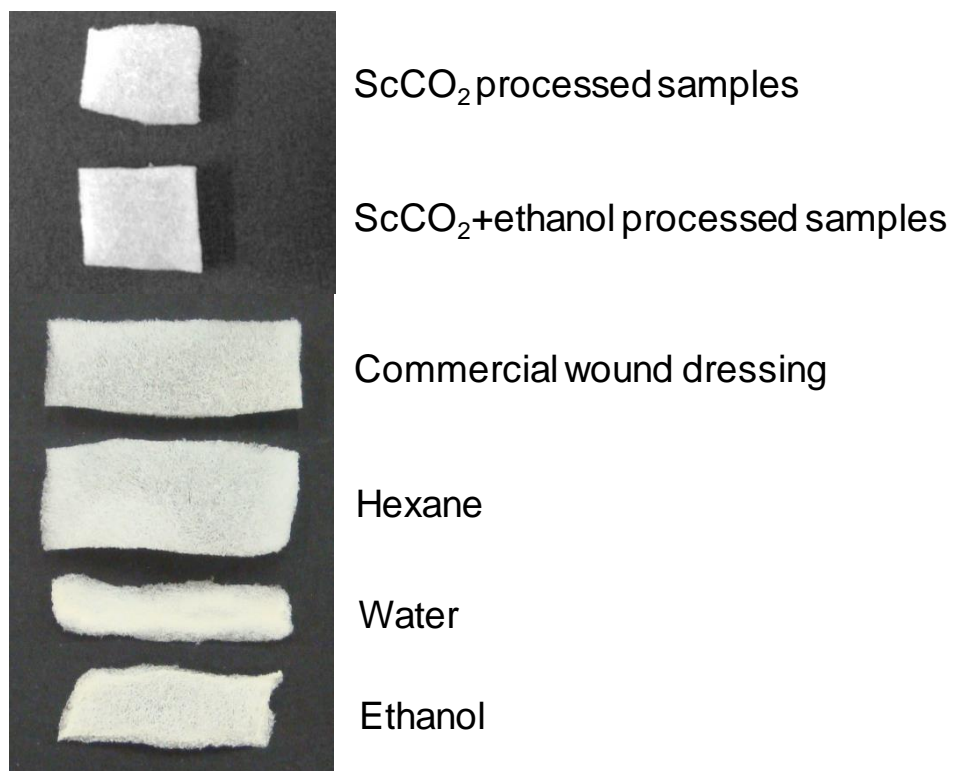


Figure S4. Macroscopic morphology of Promogran[®] samples after processing with scCO₂ and scCO₂ + EtOH (95:5 % molar) and after immersion in different organic solvents (ethanol, n-hexane and water) for 4 h.

Capítulo V

Conclusões e Sugestões

5.1 Conclusões

Nesta tese de doutorado, estudou-se a viabilidade técnica de preparar curativos medicados com agentes anti-inflamatórios, anestésicos e analgésicos de origem natural, utilizando CO₂ supercrítico. Para isso, verificou-se a capacidade de sorção de scCO₂ dos curativos e, baseando-se nestes resultados, procedeu-se a impregnação, quantificação e caracterização dos curativos impregnados.

Para a primeira etapa do trabalho, foi utilizada uma espuma de poliuretano, como curativo polimérico sintético, a ser impregnada com óleo de borage. Preliminarmente, a capacidade de sorção de scCO₂ deste curativo foi estudada em diferentes condições de temperatura, tempo e densidades de scCO₂. O poliuretano apresentou uma capacidade de sorção acima de 50%, que aumentou com a densidade de CO₂ para todas as isotermas estudadas, devido ao efeito plastificante do solvente, promovendo o inchamento do polímero. No entanto, em altas pressões, pareceu ocorrer um efeito compressivo, o que impediu um maior intumescimento do polímero. A sorção decresceu com a temperatura para todas as densidades do solvente, por conta do efeito entrópico. Baseado nestes resultados, diferentes condições de impregnação/deposição supercrítica foram testadas. Estes resultados demonstraram que a etapa controladora do processo de SSI/SSD é o equilíbrio de fases, ou seja, a alta solubilidade do óleo em scCO₂ e as interações entre óleo e polímero foram as principais responsáveis pelo rendimento do processo.

Na segunda etapa do trabalho, foram utilizados curativos comerciais de fonte natural (colágeno e celulose) e o extrato de Jambu, como API. Com pequenas alterações nas condições experimentais em relação ao poliuretano, foram realizados testes preliminares semelhantes, de capacidade de sorção de CO₂ supercrítico com o polímero. A alta capacidade de sorção de scCO₂ no polímero (aproximadamente 80%) e a relativa independência com relação à densidade do solvente supercrítico e da temperatura, cujos resultados foram quase constantes, estão provavelmente relacionados a alta porosidade do curativo de colágeno e celulose (95%). Para evitar degradação das amostras, foram utilizadas as condições de temperatura mais baixas nos ensaios de impregnação/deposição supercrítica. Os maiores rendimentos de impregnação neste

curativo ocorreram na maior densidade do solvente e maior sorção. Esta condição experimental foi repetida com o acréscimo de 5% de etanol como cossolvente e apresentou um rendimento 2,5 maior que a mesma condição sem etanol. Este efeito já era esperado, uma vez que pequenas quantidades de solventes polares podem ser acrescentadas ao processo para melhorar a solubilidade e seletividade do extrato. De maneira semelhante ao processo de SSI/SSD ocorrido com o poliuretano, o aumento da solubilidade do extrato no scCO₂ com a densidade regeu o processo de impregnação/deposição supercrítica.

Apesar de terem sido utilizados matrizes e bioativos diferentes nos trabalhos, algumas comparações podem ser feitas. Com relação a sorção de CO₂ nos polímeros, ambos materiais apresentaram uma difusão fickiana, típica de polímeros elastoméricos ou borrachosos, cuja maior sorção de CO₂ foi obtida para o *Promogran*[®], devido à maior porosidade do material, bem como, de uma maior interação entre o CO₂ e os grupamentos das cadeias de seus componentes. O poliuretano, apesar de também um polímero elastomérico e bastante poroso, pode ter apresentado uma capacidade de sorção menor, devido à presença de microporos e também da porcentagem e o tipo do segmento rígido do poliuretano, já que não foi possível conhecer a real composição do poliuretano utilizado.

Este trabalho mostrou a possibilidade de desenvolver curativos medicados para diferentes usos, com características interessantes como biocompatibilidade. No entanto, a despeito de utilizar curativos comercializados e APIS com atividade comprovada, serão necessários todos os testes e etapas solicitadas pelas agências reguladoras de saúde para que a comercialização do produto possa ser autorizada, já que são considerados produtos médicos de alto risco.

A impregnação de bioativos com CO₂ supercrítico, neste e em outros trabalhos, se mostrou uma alternativa viável aos métodos de incorporação de APIs tradicionais, a exemplo da impregnação por imersão ou via úmida, pois não danifica o polímero, permite uma dispersão e deposição homogênea e é ajustável, com possibilidade de aumentar o rendimento da impregnação/deposição, variando as condições experimentais. Além disso, o processo de impregnação com scCO₂ é benéfico ao meio

ambiente, já que utiliza pequena ou nenhuma quantidade de solvente orgânico e a depender da planta supercrítica utilizada, o CO₂ pode ser reaproveitado.

Pode-se concluir que esta tecnologia tem sido cada vez mais aplicada no desenvolvimento novas formulações farmacêuticas e biomédicas, esperando-se que, nos próximos anos, sua transposição para escala industrial, nesta área, seja realizada com sucesso.

5.2 Sugestões

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, o assunto não se esgota e muitas possibilidades de estudos futuros podem ser realizadas, com outras condições experimentais da impregnação/deposição supercrítica de modo a melhorar o rendimento (como outras taxas de despressurização, temperaturas, densidades do solvente, tempo de contato, velocidades de agitação e proporções de etanol/scCO₂), mas sempre levando a eficiência do processo (avaliação de custo/benefício).

Como continuidade deste trabalho, sugere-se a submissão dos curativos impregnados aos testes *in vitro* já citados, além do teste de permeação cutânea, realizado com uma célula de difusão (célula de Franz), utilizando pele humana, de animais ou ainda membranas sintéticas. O maior problema desse teste é encontrar os líquidos - receptor e doador para o experimento, uma vez que o extrato de jambu e o óleo de borage são lipofílicos e por isso, são difíceis de serem liberados nos meios aquosos, normalmente utilizados que simulam a pele (como PBS – solução tampão fosfato). A seguir, testes *in vivo* em modelo animal são necessários para avaliar a eficiência dos curativos (liberados pelo comitê de ética do local a ser realizado) e em caso de resultados positivos, para o prosseguimento dos estudos, os curativos precisam ser submetidos aos testes clínicos.

Por fim, uma sugestão e um desafio é o desenvolvimento de curativos totalmente naturais, pois os polímeros e bioativos naturais podem apresentar grande variabilidade em sua produção e as condições experimentais a que podem ser submetidos são limitados, a exemplo da temperatura. Por outro lado, possuem biocompatibilidade, biodegradabilidade, são não-tóxicos e podem ter baixo custo de

produção; parte das características requeridas para a próxima geração de curativos medicados.

Referências Bibliográficas

- ABDULLAH, S.A. **Solubility in Supercritical Carbon Dioxide**. 2007. 200p. Dissertação (mestrado). Otto H. York Department of Chemical Engineering, New Jersey Institute of Technology, New Jersey, 2007.
- ALMEIDA, A.P.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; SERRA, A.T.; VILA-REAL, H.; SIMPLICIO, A.L.; DELGADILHO, I.; BEIRÃO DA COSTA, S.; BEIRÃO DA COSTA, L.; NOGUEIRA, I. D.; DUARTE, C.M.M. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology Innovative. **Food Science and Emerging Technologies**, 20: 140–145, 2013.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E96-90D: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**, 2010.
- ANAND, P.; BLEY, K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. **British Journal of Anaesthesia**, 107 (4): 490–502, 2011.
- ANDREU, V.; MENDOZA, G.; ARRUEBO, M.; IRUSTA, S. Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds, **Materials**, 8, 5154-5193, 2015.
- AREERAT, S.; FUNAMI, E.; HAYATA, Y.; NAKAGAWA, D.; OHSHIMA, M. Measurement and prediction of diffusion coefficients of supercritical CO₂ in molten polymers. **Polym Eng Sci**, 44: 1915–1924, 2004.
- AROSO, I. M.; DUARTE, A.R.C.; PIRES, R.R.; MANO, J. F; REIS, R.L. Cork processing with supercritical carbon dioxide: Impregnation and sorption studies **J. of Supercritical Fluids**, 104: 251–258, 2015.
- AUBERT, J.H. Solubility of carbon dioxide in polymers by the quartz crystal microbalance technique, **J. of Supercritical Fluids**, 11: 163-172, 1998.
- BANCHERO, M.; MANNA, L.; RONCHETTI, S.; CAMPANELLI, P.; FERRI, A. Supercritical solvent impregnation of piroxicam on PVP at various polymer molecular weights. **J. of Supercritical Fluids**, 49: 271–278, 2009.
- BARBOSA, A.F. CARVALHO, M.G.; SMITH, R.E.; SABAA-SRUR, A.U.O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 26: 128–133, 2016.
- BARTLE, K.D.; CLIFFORD, A.A.; JAFAR, S.A.; SHILSTONE, G.F. Solubilities of solids and liquids of low volatility in supercritical carbon dioxide. *Phys. Chem. Ref. Data*. 20 (4): 713-756, 1991.
- BELHADJ-AHMED, F.; BADENS, E.; LLEWELLYN, P.; DENOYEL, R.; CHARBIT, G. Impregnation of vitamin E acetate on silica mesoporous phases using supercritical carbon dioxide, **J. Supercritical of Fluids**, 51: 278–286, 2009.
- BERENS, A.R.; HUVARD, G.S.; KORSMEYER, R.W.; KUNIG, F.W. Application of compressed carbon dioxide in the incorporation of additives into polymers. **J. of Applied Polymer Science**, 46: 231-242, 1992.
- BERWIG, E. **Preparação e caracterização de filmes de poliuretano com potencial aplicação na liberação controlada de fármacos**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado).

Centro de Ciências Físicas e Matemáticas: Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BIERHAULZ, A.C.K. **Desenvolvimento de biofilmes de alginato impregnados com natamicina e aferição de seu potencial antimicótico**. 2014. 207p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

BIERHAULZ, A.C.K.; SILVA, M.A.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C.; KIECKBUSCH, T.G. Effect of calcium and/or barium crosslinking on the physical and antimicrobial properties of natamycin-loaded alginate films, **LWT Food Sci. Technol.** 57: 494–501, 2014.

BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. **J. of Pharmaceutical Sciences**, 104(11): 3653-3680, 2015.

BOATENG, J.S.; MATTHEWS, K.H.; STEVENS, H. N.E.; ECCLESTON, G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review, **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 97 (8): 2892–2923, 2008.

BÖHNING, M.; SPRINGER, J. Sorptive dilation and relaxational processes in glassy polymer/gas systems-I. Poly (sulfone)and poly (ether sulfone). **Polymer**, 9(21): 5183-5195, 1998.

BOROJEVIC, R.; SERRICELLA P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 2: 16-18, 1999.

BOULEDJOUIDJA, A. **Supercritical fluid impregnation for the elaboration of sustained release drug delivery**. 2016. 201 p. Tese (Doutorado). Engenharia Ambiental: AixMarseille Université, Marselha. 2016.

BOULEDJOUIDJA, A.; MASMOUDI, Y.; SPEYBROECK, M.V.; SCHUELLER, L.; BADENS, E. Impregnation of Fenofibrate on mesoporous silica using supercritical carbon dioxide. **International Journal of Pharmaceutics**, 499: 1–9, 2016.

BRAGA, M.E.M.; MATOS, M.B.C.; DIAS, A. M. A.; SOUSA, H.C. Desenvolvimento de aplicações farmacêuticas e biomédicas através de métodos de impregnação/deposição com fluidos supercríticos. In: SOUSA, H.C.; BRAGA, M.E.M; SOSNIK, A. (eds.). **Biomateriais Aplicados ao Desenvolvimento de Sistemas Terapêuticos Avançados**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2015, cap. 8, 309-383.

BRAGA, M.E.M.; PATO, M.T.V.; SILVA, H.S.R.C.; FERREIRA, E.I.; GIL, M.H.; DUARTE, C.M.M.; SOUSA, H.C. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives, **J. of Supercritical Fluids**, 44: 245-257, 2008.

BRANTLEY, N.H.; KAZARIAN, S.G.; ECKERT, C.A. In situ FTIR measurement of carbon dioxide sorption into poly (ethylene terephthalate) at elevated pressures. **J. Appl. Polym. Sci.** 77: 764–775, 2000.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Regulamento Técnico que trata do registro, alteração,

revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Brasília, 2001.

BRISCOE, B. J.; KELLY, C. T. The effect of structure on gas solubility and gas induced dilation in a series of poly(urethane) elastomers. **Polymer**, 37: 3405-3410, 1996.

BRUNNER, G. **Gas Extraction**. First ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1994.

BUENO, C.Z.; VEIGA, I.G.; OLIVEIRA, F.L.; VIEIRA e ROSA, P.T.; MORAES, A.M. Aspectos econômicos do desenvolvimento de produtos para aplicações biomédicas. In: SOUSA, H.C.; BRAGA, M.E.M; SOSNIK, A. (eds.). **Biomateriais Aplicados ao Desenvolvimento de Sistemas Terapêuticos Avançados**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2015, cap. 19, 727-766.

BUSH, R. AKGERMAN, A. HALL, K.R. Synthesis of controlled release device with supercritical CO₂ and co-solvent, **J. of Supercritical Fluids**, 41: 311–316, 2007.

CABEZAS, L.I.; FERNÁNDEZ, V.; MAZARRO, R.; GRACIA, I.; DE LUCAS, A.; RODRÍGUEZ, J.F. Production of biodegradable porous scaffolds impregnated with indomethacin in supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids**, 63: 155–160, 2012.

CABEZAS, L.I.; GRACIA, I.; GARCÍA, M.T.; DE LUCAS, A.; RODRÍGUEZ, J.F. Production of biodegradable porous scaffolds impregnated with 5-fluorouracil in supercritical CO₂, **J. of Supercritical Fluids**, 80: 1–8, 2013.

CANSELL, F.; AYMONIER, C.; LOPPINET-SERANI, A. Review on materials science and supercritical fluids. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 7: 331–340, 2003.

CARDOSO, C.R.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.V.; FAVORETO JR., S.; PENA, J.D.O. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound repair and regeneration**, 12(2): 235-243, 2004.

CARDOSO, C.R.; FAVORETO JR., S.; OLIVEIRA, L.L.; VANCIM, J.O.; BARBAN, G.B.; FERRAZ, D.B.; SILVA, J.S. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair. **Immunobiology**, 216: 409–415, 2011.

CAVALCANTI, V.M.S. **Extração de Spilanthol de *Spilanthes var oleraceae* com dióxido de carbono supercrítico**. 2008. 144p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CHAMPEAU, M.; THOMASSIN, J.-M.; TASSAING, T.; JÉRÔME C. In situ FTIR microspectroscopy to investigate polymeric fibers under supercritical carbon dioxide: CO₂ sorption and swelling measurements. **J. of Supercritical Fluids**, 90: 44–52, 2014.

CHAMPEAU, M.; THOMASSIN, J.-M.; TASSAING, T.; JÉRÔME C. Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review. **J. of Controlled Release**, 209: 248–259, 2015a.

CHAMPEAU, M.; THOMASSIN, J.-M.; TASSAING, T.; JÉRÔME C. Drug loading of sutures by supercritical CO₂ impregnation: effect of polymer/drug interactions and thermal transitions. **Macromol. Mater. Eng.** 300 (6): 596–610, 2015b.

- CHUNG, S.; GENTILINI, C.; CALLANAN, A.; HEDEGAARD, M.; HASSING, S.; STEVENS, M.M. Responsive poly (g-glutamic acid) fibres for biomedical applications, **J. Mater. Chem. B** **1**, 1397–1401, 2013.
- COMIN, L.M.; TEMELLI, F.; SALDANA, M.D.A. Impregnation of flax oil in pregelatinized corn starch using supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids** **61**: 221–228, 2012.
- COSTA, P.F. Bone Tissue Engineering Drug Delivery. **Curr. Mol. Bio. Rep.**, **1**: 87–93, 2015.
- COSTA, V.P.; BRAGA, M.E.M.; GUERRA, J.P.; DUARTE, A.R.C.; DUARTE, C.M.M.; LEITE, E.O.B.; GIL, M.H.; SOUSA, H.C. Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method, **J. of Supercritical Fluids**, **52**: 306–316, 2010.
- CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. Second ed. Oxford: Clarendon Press, 1975
- CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**, 3ª edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2011. 310 p.
- DAVIS, P.K.; LUNDY, G.D.; PALAMARA, J.E.; LARRY DUDA, J.L.; DANNER, R.P. New Pressure-Decay Techniques to Study Gas Sorption and Diffusion in Polymers at Elevated Pressures. **Ind. Eng. Chem. Res.**, **43**: 1537-1542, 2004.
- DIAS, A.M.A.; BRAGA, M.E.M.; SEABRA, I.J.; FERREIRA, P.; GIL, M.H.; SOUSA, H.C. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **Int. J. Pharm.** **408**: 9–19, 2011.
- DIAS, A. M. A.; BRAGA, M. E. M.; SEABRA, I. J.; SOUSA, H. C. Supercritical Solvent Impregnation of Natural Bioactive Compounds in N-carboxybutylchitosan and Agarose Membranes for the Development of Topical Wound Healing Applications In: Natal Jorge, R., Tavares, J., Pinotti Barbosa, M., Slade, A.P. (Eds.). **Technologies for Medical Sciences**, Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, vol. 1, 243-266.
- DIAS, A.M.A.; REY-RICOB, A.; OLIVEIRA R.A.; MARCENEIRO, S.; ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, C. A.; JÚNIOR, R.N.C.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **J. Supercrit. Fluids**, **74**: 34–45, 2013.
- DIAS, A.M.A.; SILVA, A.C.S. da; BOTELHO, J.R.S; JÚNIOR, R.N.C.; SOUSA, H.C. BRAGA, M.E.M. Temperature and density effects of the scCO₂ extraction of spilanthol from *Spilanthus acmella* flowers. **J. of Supercritical Fluids**. **121**: 32–40, 2017.
- DÍEZ-MUNICIO, M.; MONTILLA, A.; HERRERO, M.; OLANO, A.; IBÁÑEZ E. Supercritical CO₂ impregnation of lactulose on chitosan: A comparison between scaffolds and microspheres form. **J. of Supercritical Fluids**, **57**: 73–79, 2011.
- DUARTE, A.R.C.; ANDERSON, L.E.; DUARTE, C.M.M.; KAZARIAN, S.G. A comparison between gravimetric and in situ spectroscopic methods to measure the sorption of CO₂ in a biocompatible polymer, **J. of Supercritical Fluids**, **36**:160-165, 2005.

- DUARTE, A.R.C.; MARTINS, C.; COIMBRA, P.; GIL, M.H.M.; SOUSA, H.C.; DUARTE, C.M.M. Sorption and diffusion of dense carbon dioxide in a biocompatible polymer. **J. Supercrit. Fluids**, 38: 392–398, 2006a.
- DUARTE, A.R.C.; COSTA, M.S.; SIMPLÍCIO, A.L.; CARDOSO, M.M.; DUARTE, C.M.M. Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs. **Int. J. Pharm.** 308: 168–174, 2006b.
- DUARTE, A.R.C.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Supercritical fluids in biomedical and tissue engineering applications: a review. **International Materials Reviews**, 54 (4): 214–222, 2009a.
- DUARTE, A.R.C.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Perspectives on: Supercritical Fluid Technology for 3D Tissue Engineering Scaffold. **Applications Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 24: 385–400, 2009b.
- DUARTE, A.R.C.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. **European Polymer Journal**, 45: 141–148, 2009c.
- DUARTE, A.R.C.; SANTO, V.E.; ALVES, A.; SILVA, S.S.; MOREIRA-SILVA, J.; SILVA, T.H.; MARQUES, A.P.; RUI A. SOUSA, R.A.; GOMES, M.E.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Unleashing the potential of supercritical fluids for polymer processing in tissue engineering and regenerative medicine. **J. of Supercritical Fluids**, 79: 177–185, 2013.
- EHRENREICH, M.; RUSZCZAK, Z. Update on tissue-engineered biological dressings. **Tissue Engineering**, 12 (9): 2407–2424, 2006.
- ELVIRA, C.; FANOVICH, A.; FERNÁNDEZ, M.; FRAILE, J.; SAN ROMÁNA, J.; DOMINGO, C. Evaluation of drug delivery characteristics of microspheres of PMMA–PCL–cholesterol obtained by supercritical-CO₂ impregnation and by dissolution–evaporation techniques. **Journal of Controlled Release**, 99: 231 – 240, 2004.
- FANOVICH, M.A.; IVANOVIC, J., MISIC, D.; ALVAREZ, M.V.; JAEGER, P. ZIZOVIC, I.; EGGERS, R. Development of polycaprolactone scaffold with antibacterial activity by an integrated supercritical extraction and impregnation process. **J. of Supercritical Fluids**, 78: 42–53, 2013.
- FARAHPOUR, M.R.; MAVADDATI, A.H. Effects of borage extract in rat skin wound healing model, histopathological study. **Journal of Medicinal Plants Research**, 6(5): 651–656, 2012.
- FARAHPOUR, M.R.; TAGHIKHANI, H.; HABIBI, M. ZANDIEH, M.A. Wound healing activity of flaxseed *Linum usitatissimum* L. in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5(21): 2386–2389.
- FARSAEI, S.; KHALILI H.; FARBOUD, E.S. Potential role of statins on wound healing: review of the literature. **International Wound Journal**, 9:238–247, 2012.
- FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**. 5(1): 83–91, 2010.
- FELIBERTI, M.I. **Estudo da Permeabilidade de gases em compósitos de polietileno**. 1985. 88p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

- FITZGERALD, R.H.; STEINBERG, J.S. Collagen in Wound Healing: Are We onto something new or just repeating the past? **The Foot and Ankle Online Journal**, 2 (9): 3, 2009. doi: 10.3827/faoj.2009.0209.0003.
- FLICHY, N.M.B. KAZARIAN, S.G. LAWRENCE, C.J.; BRISCOE, B.J. An ATR-IR Study of Poly (Dimethylsiloxane) under High-Pressure Carbon Dioxide: Simultaneous Measurement of Sorption and Swelling. **J. Phys. Chem. B**, 106 (4): 754–759, 2002.
- FRANCO, D.; GONÇALVES, L.F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.** 35 (3): 203-206, 2008.
- FREITAS, V.S. de. **Desenvolvimento e avaliação da eficiência de um bioadesivo contendo extrato de *Spilanthes Acmella* L. Murray para administração oral como anestésico tópico.** 2014. 105p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2014.
- FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, Nociception and Pain. **Molecules**, 21: 797, 2016. doi:10.3390/molecules21060797
- FRONZA, M.; HEINZMANN, B.; HAMBURGER, M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, 126: 463–467, 2009.
- GAMSE, T.; MARR, R.; WOLF, C.; LEDERER, K. Supercritical CO₂ impregnation of polyethylene components for medical purposes, **Hem. Ind.** 61: 229–232, 2007.
- GASPAR, F.; LU, T.; MARRIOTT, R.; MELLOR, S.; WATKINSON, C.; AL-DURI, B.; SANTOS, R.; SEVILLE, J. Solubility of Echium, Borage, and Lunaria Seed Oils in Compressed CO₂, **J. Chemical & Engineering Data**, 48: 107-109, 2003.
- GONG, K.; DARR, J.A.; REHMAN, I.U. Supercritical fluid assisted impregnation of indomethacin into chitosan thermosets for controlled release applications. **International Journal of Pharmaceutics**, 315: 93–98, 2006.
- GOÑI, M.L.; GANÁN, N.A.; STRUMIAC, M.C.; MARTINI, R.E. Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. **J. of Supercritical Fluids**, 111: 28–35, 2016.
- GUNEY, O.; AKGERMAN, A. Synthesis of controlled-release products in supercritical medium, **AIChE J.** 48: 856–866, 2002.
- GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors Affecting Wound Healing, **J. Dent. Res.** 89(3):219-229, 2010.
- GUPTA, R.B.; SHIM, J. J. **Solubility in Supercritical Carbon Dioxide**, Boca Raton: CRC Press, 2007. 960 p.
- GUPTA, N.; PATEL, A.R.; RAVINDRA, R.V. Design of Akkalkara (*Spilanthes Acmella*) formulations for antimicrobial and topical anti-inflammatory activities. **International Journal of Pharma and Bio Sciences.** 3(4):161 – 170, 2012.
- GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, 453: 314-321, 2008.
- HANNA, J.R.; GIACOPELLI, J.A. A Review of Wound Healing and Wound Dressing Products. **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, 36(1):2-14, 1997.

- HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**, 88(2): 53-58, 2007.
- HE, W.; LV, W.; DICKERSON, J.H. Gas Diffusion Mechanisms and Models. **Gas Transport in Solid Oxide Fuel Cells**, SpringerBriefs in Energy: 9-17, 2014.
- HEATH, D.E.; COOPER, S.L. Polymers: basic principles. IN: Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E. (Eds.). **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 3ª edição. Oxford, Elsevier, 2013, capítulo 1.2.2, 64-78.
- ITO, S.; MATSUNAGA, K.; TAJIMA, M.; YOSHIDA, Y. Generation of Microcellular Polyurethane with Supercritical Carbon Dioxide. **J. Applied Polymer Science**, 106: 3581–3586, 2007.
- IVANOVIC, J.; KNAUER, S.; FANOVICH, S.A.; MILOVANOVIC, S.; STAMENIC, M.; JAEGER, M.P.; ZIZOVIC, I.; EGGERS, R. Supercritical CO₂ sorption kinetics and thymol impregnation of PCL and PCL-HA. **J. of Supercritical Fluids**, 107: 486–498, 2016.
- JACOBS, M.A. **Measurement and modeling of thermodynamic properties for the processing of polymers in supercritical fluids**. 2004. 133p. Tese (Doutorado). Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven, 2004.
- JESPERSEN, H.T. **Studies of sorption and modification of polymers films in supercritical carbon dioxide**. Sorption, desorption and metal impregnation. 2002. 104p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química: Universidade de Copenhagen, Copenhagen, 2002.
- JIMÉNEZ, A.; THOMPSON, G.L.; MATTHEWS, M.A.; DAVIS, T.A.; CROCKER, K.; LYONS, J.S.; TRAPOTSIS, A. Compatibility of medical-grade polymers with dense CO₂. **J. of Supercritical Fluids**, 42: 366–372, 2007.
- JONES, V.; GREY, J.E.; HARDING, K.G. ABC of wound healing: Wound dressings. **BMJ**, 332: 777-780, 2006.
- KAMIYA, Y.; MIZOGUCHI, K.; TERADA, K.; FUJIWARA, Y.; WANG, J-S. CO₂ Sorption and Dilation of Poly (methyl methacrylate). **Macromolecules**, 31: 472-478, 1998.
- KAPOOR, R.; HUANG, Y.-S. Gamma Linolenic Acid: An Antiinflammatory Omega-6 Fatty Acid. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 7:531-534, 2006.
- KAZARIAN S.G.; BRANTLEY, N.; VINCENT, M.F.; WEST, B.L.; LIOTTA, C.L.; ECKERT, C.A. Supercritical fluid impregnation of dye into glassy polymers, **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, 212: 50- PMSE, 1996.
- KAZARIAN, S.G., VINCENT, M.F.; WEST, B.L.; ECKERT, C.A. Partitioning of solutes and cosolvents between supercritical CO₂ polymer phases. **J. of Supercritical Fluids**, 13: 107–112, 1998.
- KAZARIAN, S.G. Polymer processing with supercritical fluids **Polymer Science Ser. C**. 42: 78–101, 2000.
- KAZARIAN, S.G.; MARTIROSYAN, G.G. Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP, **Int. J. Pharm.** 232: 81–90, 2002.

- KIKIC, I. Polymer–supercritical fluid interactions, **J. of Supercritical Fluids**, 47: 458–465, 2009.
- KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 7: 399–405, 2003.
- KIM, G.H.; KANG, Y.M.; KANG, K.N.; KIM, D.Y.; KIM, H.J.; MIN, B.H.; KIM, J.H.; KIM, M.S. Wound Dressings for Wound Healing and Drug Delivery. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 8 (1): 1-7, 2011.
- KNEZ, Ž.; MARKOČIČ, E.; LEITGEB, M.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ HRNČIČ, M.; ŠKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, 77: 235-243, 2014.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, 203: 93–98, 2010.
- KOPCAK, U. **Extração de cafeína das sementes da planta do guaraná (*Paullinia cupana*) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes**. 2003.222 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- KOPCAK, U.; MOHAMED, R.S. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. **J. of Supercritical Fluids**, 34: 209–214, 2005.
- LANG, Q.; WAI, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. **Talanta**, 53: 771–782, 2001.
- LAVAGNA, S.M.; SECCI, D.; CHIMENTI, P.; BONSIGNORE, L.; OTAVIANNI, A.; BIZZARRI, B. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. **Il Farmaco** 56: 451–453, 2001.
- LEWIS, K.W.; SPAZIERER, D.; URBAN, M. D.; LIN, L.; REDL, H.; GOPPELT, A. Comparison of regenerated and non-regenerated oxidized cellulose hemostatic agents. **Eur. Surg.** 45:213–220, 2013.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology** 25: 9– 18, 2007.
- LÍSA, M.; HOLČAPEK, M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, **Journal of Chromatography A** 1198-1199: 115-130, 2008.
- LIU, D.; TOMASKO, D.L. Carbon dioxide sorption and dilation of poly(lactide-co-glycolide). **J. of Supercritical Fluids**, 39: 416–425, 2007.
- LÓPEZ-PERIAGO, A.; ARGEMÍ, A.; ANDANSON, J. M.; FERNÁNDEZ, V.; GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A.; KAZARIANC, S. G.; SAURINAB, J.; DOMINGO C. Impregnation of a biocompatible polymer aided by supercritical CO₂: Evaluation of drug stability and drug–matrix interactions. **J. of Supercritical Fluids**, 48: 56-63, 2009.
- LYRA, M.A.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; BRASILEIRO, M.T.; ROCA, M.F. de LA; BARRAZA, J.A.; VIANA, O.S.; ROLIM-NETO, P.J. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Lat. Am. J. Pharm.** 26 (5): 784-793, 2007.

- MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 78 (4): 393-410, 2003.
- MANHEZI, A.C.; BACHION, M.M.; PEREIRA, A.L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 61 (5): 620-628, 2008.
- MANNA, L. BANCHERO, M.; SOLA, D.; FERRI, A.; RONCHETTI, S.; SICARDI, S. Impregnation of PVP microparticles with ketoprofen in the presence of supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids**, 42: 378–384, 2007.
- MARIZZA, P.; PONTONI, L.; RINDZEVICIUS, T.; ALOPAEUS, J.F.; SU, K.; ZEITLER, J.A.; KELLER, S.S.; KIKIC, I.; MONEGHINI, M.; DE ZORDI, N. SOLINAS, D. CORTESI, A.; BOISEN, A. Supercritical impregnation of polymer matrices spatially confined in microcontainers for oral drug delivery: Effect of temperature, pressure and time. **J. of Supercritical Fluids**, 107: 145–152, 2016.
- MASMOUDI, Y.; AZZOUK, L. B.; FORZANO, O.; ANDRE, J.M.; BADENS, E. Supercritical impregnation of intraocular lenses. **J. of Supercritical Fluids**, 60: 98–105, 2011.
- MEDEIROS, G.R.; FERREIRA, S.R.S.; CARCIOFI, B.A.M. High pressure carbon dioxide for impregnation of clove essential oil in LLDPE films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 41: 206–215, 2017.
- METCALFE, A.D.; FERGUSON, M.W.J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **J. R. Soc. Interface**, 4: 413–437, 2007.
- MILOVANOVIC, S.; JANKOVIC-CASTVAN, I.; IVANOVIC J.; ZIZOVIC I. Effect of starch xero- and aerogels preparation on the supercritical CO₂ impregnation of thymol. **Starch/Stärke**, 67: 174–182, 2015.
- MINELLI, M.; DE ANGELIS, M.G. An equation of state (EoS) based model for the fluid solubility in semicrystalline polymers. **Fluid Phase Equilibria**. 367: 173-181, 2014.
- MOGOŠANU, G.D.; GRUMEZESCU, A.M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing, **Int. J. of Pharmaceutics**, 463: 127–136, 2014.
- MOLAN, P.C.; BETTS, J.A. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *Journal of Wound Care*. 13(9): 33-356, 2004.
- MOTEALLEH, B.; ZAHEDI, P.; REZAEIAN, I.; MOGHIMI, M.; ABDOLGHAFARI, A.H.; ZARANDI, M.A. Morphology, drug release, antibacterial, cell proliferation, and histology studies of chamomile-loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly(E-caprolactone)/polystyrene blends. **J. Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**. 102B (5): 977-987, 2014.
- MOURA, L.I.F.; DIAS, A.M.A.; CARVALHO, E.; SOUSA, H.C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. **Acta Biomat**. 9: 7093–7114, 2013.
- MUSTAPA, A.N.; MARTINA, A.; SANZ-MORAL, L.M.; RUEDA, M.; COCERO, M.J. Impregnation of medicinal plant phytochemical compounds into silica and alginate aerogels. **J. of Supercritical Fluids**, 116: 251–263, 2016.

NALAWADE, S.P.; PICCHIONI, F.; MARSMAN, J.H.; JANSSEN, L.P.B.M. The FT-IR studies of the interactions of CO₂ and polymers having different chain groups, **J. of Supercritical Fluids**, 36: 236–244, 2006.

NATU, M.V.; GIL, M.H.; SOUSA, H.C. Supercritical solvent impregnation of poly(caprolactone) /poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) and poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications, **J. of Supercritical Fluids**, 47: 93–102, 2008.

NIST, National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso: 20 ago. de 2016.

PANTIC, M.; KOTNIK, P.; KNEZ, Ž.; NOVAK, Z. High pressure impregnation of vitamin D₃ into polysaccharide aerogels using moderate and low temperatures. **J. of Supercritical Fluids**, 118: 171–177, 2016.

PARENTE, L.M.L.; LINO JÚNIOR, R.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; VINAUD, M.C.; DE PAULA, J.R.; PAULO, N.M. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012: 375671, 2012.

PASCOAL, D.R.C.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.M., VELOZO, E.S.; DE SOUSA, H.C.; VIEIRA DE MELO, S.A.B.; BRAGA, M.E.M. Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: A potential alternative topical anti leishmanial treatment, Accepted in **J. Supercrit. Fluids**, 2017.

PASQUALI, I.; BETTINI, R. Are pharmaceuticals really going supercritical? **Int. J. Pharm.**, 364 (2): 176–187, 2008.

PEREIRA, V. J. **Modelagem e Simulação da Impregnação do Óleo de Borage em Membranas de Poliuretano usando CO₂ a alta pressão para aplicações médicas**. 2015. 139p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

PERRUT, M. CLAVIER, J-Y. Supercritical Fluid Formulation: Process Choice and Scale-up. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 42: 6375-6383, 2003.

PIESZAK, M.; MIKOŁAJCZAK, P. Ł.; MANIKOWSKA, K. Borage (*Borago officinalis* L.) - a valuable medicinal plant used in herbal medicine, **Herba Polonica**, 58: 95-101, 2012.

REVERCHON, E.; ADAMI, R. CARDEA, S., PORTA, G.D. Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceuticals and medical applications. **J. of Supercritical Fluids**, 47: 484–492, 2009.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. 2ª edição. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 460 p.

SATO, Y.; TAKIKAWA, T.; TAKISHIMA, S.; MASUOKA, H. Solubilities and diffusion coefficients of carbon dioxide in poly(vinyl acetate) and polystyrene. **J. of Supercritical Fluids**, 19: 187–198, 2001.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem natural e desenvolvimento de medicamentos. IN: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Da planta ao**

medicamento. 6ª edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1104p. 371-402.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E.M.M.; BITTENCOURT, C.F.; ZANETTI, G.D; HEINZMANN, B.M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**. 122: 523–532, 2009.

SEADER, J.D.; HENLEY, E.J. **Separation Process Principles**. 2rd. ed., New York: Wiley, 2006. 756p.

SHEN, Z.; HUWARD, G. S.; WARRINER, C. S.; HUGH, M.M.; BANYASZ, J.L.; MISHRA, M. K. CO₂-assisted fiber impregnation, **Polymer**, 49: 1579-1586, 2008.

SHEN, X.; SHAMSHINA, J.L.; BERTON, P.; GURAU, G.; ROGERS, R.D. Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties, and applications. **Green Chem.** 18: 53–75, 2016.

SILVA, S.S.; CARIDADE, S.G.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Effect of crosslinking in chitosan/aloë vera-based membranes for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, 98: 581–588, 2013a.

SILVA, S.S.; POPA, E.G.; GOMES, M.E.; CERQUEIRA, M.; MARQUES, A.P.; CARIDADE, S.G.; TEIXEIRA, P.; SOUSA, C.; MANO, J.F.; REIS, R.L. An investigation of the potential application of chitosan/aloë-based membranes for regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, 9: 6790–6797, 2013b.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing, **The New England Journal of Medicine**, 341 (10): 738-746, 1999.

SINGER, A.J.; DAGUM, A.B. Current management of acute cutaneous wounds. **The New England Journal of Medicine**, 359 (10): 1037-1046, 2008.

ŠKERGET, M.; KNEZ, Z.; KNEZ-HRNČIČ, M. Solubility of solids in sub- and supercritical fluids: a review, **J. Chem. Eng. Data**, 56: 694–719, 2011.

SOUZA, A.C.; DIAS, A.M.A.; SOUSA, H. C.; TADINI, C. C. Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging. **Carbohydrate Polymers**, 102: 830–837, 2014.

SRIVASTAVA, J.K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. **Mol. Med. Report**. 3(6): 895–901, 2010.

SUBRAHMANYAM, R.; GURIKOV, P.; MEISSNER, I.; SMIRNOVA, I. Preparation of biopolymer aerogels using green solvents, **J. Vis. Exp.** 113: 54116–54221, 2016.

TABERNERO, A.; MARTÍN DEL VALLE, E.M.; GALÁN, M. A. Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling. **Chemical Engineering and Processing**, 60: 9–25, 2012.

TABERNERO, A.; VIEIRA DE MELO, S.A.B.; MAMMUCARI, R.; MARTÍN DEL VALLE, E.M.; FOSTER, N.R. Modelling solubility of solid active principle ingredients in sc-CO₂ with and without cosolvents: A comparative assessment of semiempirical models

- based on Chrastil's equation and its modifications. **J. of Supercritical Fluids**. 93: 91–102, 2014.
- TANG, M.; DU, T-B. CHEN, Y-P. Sorption and diffusion of supercritical carbon dioxide in polycarbonate. **J. of Supercritical Fluids**, 28: 207–218, 2004.
- TEO, L-S.; KUO, J-F.; CHEN, C-Y. Permeation and Sorption of CO₂ Through Amine-Contained Polyurethane and Poly(urea-urethane) Membranes, **J. Applied Polymer Science** 59: 1627-1638, 1996.
- TIWARI, K.L.; JADHAV, S.K.; JOSHI, V. An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. **J. of Chinese Integrative Medicine**. 9 (11): 1170-1178, 2011.
- TKALEC, G.; PANTIĆ, M.; NOVAK, Z.; KNEZ, Ž. Supercritical impregnation of drugs and supercritical fluid deposition of metals into aerogels. **J. Mater Sci**. 50:1–12, 20015.
- TOMASKO, D.L.; LI, H.; LIU, D.; HAN, X.; WINGERT, M.J.; LEE, L.J. KOELLING, K.W. A review of CO₂ applications in the processing of polymers, **Industrial Engineering Chemical Research**, 42: 6431-6456, 2003.
- TORRES, A.; ROMERO, J.; MACAN, A.; GUARDA, A.; GALOTTO, M.J. Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used
- ÜZER, S.; AKMAN, U.; HORTAÇSU, O. Polymer swelling and impregnation using supercritical CO₂: a model-component study towards producing controlled release drugs. **J. of Supercritical Fluids**, 38: 119–128, 2006.
- VARONA, S.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J.; DUARTE, C.M.M. Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch, **J. of Supercritical Fluids**, 58: 313–319, 2011.
- VAUGHN, A.R.; BRANUM, A.; SIVAMANI, R.K. Effects of Turmeric (*Curcuma Longa*) on Skin Health: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Phytother. Res**. 30 (8): 1243-1264, 2016.
- VIEIRA, M.G.A.; SILVA, M. A., SANTOS, L.O.; BEPPU, M.M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**. 47: 254-263.
- VYAS, N., KHAN, M.Y., PANCHAL, S., BUTANI, A., KUMAR, V. Supercritical Fluid Technology – An Unlimited Frontier in Herbal Research. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, 1(4): 303-308, 2009.
- WEIDNER, E., Impregnation via supercritical CO₂ – What we know and what we need to know. Accepted in **J. of Supercritical Fluids**, 2017.
- WILD, T.; RAHBARNIA, A.; KELLNER, M.; SOBOTKA, L. Basics in nutrition and wound healing, **Nutrition** 26: 862–866, 2010.
- WISSINGER, R.G.; PAULATIES, M.E. Swelling and sorption in polymer-CO₂ mixtures at elevated pressures, **J. of Polymer Science Polymer Physics**, 25: 2497-2510, 1987.
- WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing, **Wound Healing**, 77(3): 509-528, 1997.
- YAMANE, L.T.; Avaliação de formulações tópicas contendo extrato etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (jambu), associado a óleo essencial de *Achyrocline*

satureioides Lam (macela). 2016. 81p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas: Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

YAÑEZ, F.; MARTIKAINEN, L.; BRAGA, M. E. M.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; Duarte, C. M. M. Gil, M. H.; DE SOUSA, H. C. Supercritical fluid-assisted preparation of imprinted contact lenses for drug delivery, **Acta Biomater.**, 7: 1019-1030, 2011.

YODA, S.; SATO, K.; OYAMA, H.T. Impregnation of paclitaxel into poly (DL-lactic acid) using high pressure mixture of ethanol and carbon dioxide, **RSC Adv.**, 1: 156–162, 2011.

YOGANATHAN, R.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N.R. Impregnation of Ibuprofen into polycaprolactone using supercritical carbon dioxide, **Journal of Physics Conference Series**, 215(1): 012087, 2010.

YU, J.; TANG, C.; GUAN, Y.; YAO, S.; ZHU, Z. Sorption and Diffusion Behavior of Carbon Dioxide into Poly (l-lactic acid) Films at Elevated Pressures. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 21(11): 1296–1302, 2013.

ZHANG, J.; MARTIN, D.J.; TARAN, E.; THURECHT, K.J.; MINCHIN, R.F. Effect of supercritical carbon dioxide on the loading and release of model drugs from polyurethane films: comparison with solvent casting, **Macromol. Chem. Phys.** 215: 54–64, 2014.

ZHONG, S.P.; ZHANG, Y.Z.; LIM, C.T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction, **WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.**, 2: 510–525, 2010.

| Apêndices

A1. LISTA DE PUBLICAÇÕES

[1] SILVA, C.V. da; PEREIRA, V.J.; ROSA, P.T.V.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.M.; VIEIRA DE MELO, S.A.B.; COSTA, G.M.N.; SOUSA, H.C. de; DIAS, A.M.A.; BRAGA, M.E.M. Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 115, p. 1-9, 2016.

[2] SILVA, C.V. da; PEREIRA, V.J.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.M.; VIEIRA DE MELO, S.A.B.; COSTA, G.M.N.; SOUSA, H.C. de; DIAS, A.M.A.; BRAGA, M.E.M. Supercritical solvent impregnation/deposition of spilanthol enriched extracts (from *Spilanthes acmella*) into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing. **Journal of Supercritical Fluids**, 2018.

[3] PEREIRA, V.J.; SILVA, C.V.; BRAGA, M.E.; DIAS, A.M.; SOUSA, H.C.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.; COSTA, G.M.; VIEIRA DE MELO, S.A. Modeling and Simulation of Dense Carbon Dioxide Desorption from a Polyurethane-Based Wound Dressing. **CAIQ2015 - VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química**, 2015.

[4] C.V. DA SILVA, V.J. PEREIRA, G.M.N. COSTA, E.C.M. CABRAL-ALBUQUERQUE, S.A.B. VIEIRA DE MELO, A.M.A. DIAS, H.C. DE SOUSA, M.E.M. BRAGA. Measurement and Modelling of the Sorption and Diffusion of Supercritical CO₂ in Synthetic- and Natural-Based Polymers. **16th European Meeting on Supercritical Fluids (EMSF)**, Lisbon, Portugal, April 25-28, 2017. (Poster).

A.2. GLOSSÁRIO DE TERMOS TÉCNICOS (ÁREA MÉDICO-FARMACÊUTICA)

Absorção percutânea – que se realiza através da pele intacta por meio de seringa ou sonda.

Afecção – doença

Agente patogênico ou etiológico – qualquer organismo causador de infecções ou doenças

Agente pró-inflamatório – mediador químico que serve para ativar ou aumentar aspectos da inflamação

Agregação plaquetária – formação de trombo pela agregação de plaquetas (células encontradas no sangue) para auxiliar na interrupção de um sangramento

Aminoácidos – moléculas unitárias formadoras de proteínas, tecidos, enzimas e células

Analgésicos – substâncias que reduzem a sensação de dor

Anestésicos – substâncias que diminuem a sensibilidade do local

Angiogênico – promove regeneração de vasos sanguíneos

Antibióticos ou antimicrobianos – APIs utilizados para tratamento de infecções bacterianas

Antisséptico - desinfetante

Atóxico – sem toxicidade

Biocompatível – capacidade de se adequar ao corpo humano sem provocar danos ou

Biodegradabilidade – degradação natural

Biomateriais – substâncias compatíveis com tecidos vivos

Características reológicas – relaciona-se com a viscosidade do material

Carcinogenicidade - verifica o potencial do produto em causar câncer

Catéter – tubo ou sonda para drenagem ou injeção de líquidos ou medicamentos, desobstrução de passagens ou para investigação de doenças.

Citotoxicidade – teste para verificar a toxicidade do material a ser testado para as células

Coágulo ou trombo – massas de células e proteínas do sangue, que são produzidas por uma série de reações para parar um sangramento

Colágeno – proteína formadora do tecido conjuntivo e da matriz extracelular. Pode ser classificado em 13 tipos, sendo os três primeiros tipos os mais importantes. O tipo I está

presente nos tendões, ossos e pele. O tipo II está presente nas cartilagens das articulações e entre as vértebras. O tipo III está em músculos e órgãos específicos como baço, pulmões, artérias, fígado, útero e intestinos.

Contaminantes – corpos estranhos, microrganismos (fungos e bactérias)

Curativo seco – são aqueles que possuem alta aderência, baixa capacidade de absorção, requerem troca frequente, dificultam a manutenção da umidade, são permeáveis a bactérias e podem provocar inflamação.

Curativos ativos – aceleram o processo de cicatrização

Curativos inertes – não contribuem ativamente para o processo de cicatrização

Curativos úmidos – capazes de manter umidade e a troca gasosa no local da ferida

Debridamento – limpeza ou remoção de tecido morto

Derme – camada interna da pele

Desidratação – perda de água

Elastinas – principais proteínas presentes nas fibras elásticas como músculos, paredes arteriais e ligamentos

Emoliente – restaura a oleosidade e hidratar a pele

Enzimas – proteínas capazes de acelerar uma determinada reação química, a exemplo da hidrólise de outras proteínas (colagenase – acelera a degradação do colágeno).

Enzimas remodelantes – catalisam reações químicas com o objetivo de hidrolisar (quebrar substâncias) como proteínas (proteases) e colágeno (colagenases) com o objetivo de destruir o tecido danificado da pele

Epiderme - camada superficial da pele

Exsudato – líquido com alto teor de proteínas e células produzido como reação ao ferimento

Fase de proliferação – produção de células para recompor o tecido lesionado

Fatores de crescimento – grupo de substâncias de origem proteica que estimulam a proliferação celular

Fibroblastos – células que produzem fibras e colágeno e em caso de lesão, são responsáveis pela regeneração da pele.

Formulações Farmacêuticas Tópicas – medicamentos utilizados no local da lesão

Genotoxicidade – verifica o potencial do produto em causar toxicidade ao DNA

Glicosídeos – substâncias químicas formadas por um monossacarídeo e uma outra molécula não derivada da glicose.

Glicosaminoglicanos - polímeros dissacarídicos que se repetem ao longo de uma cadeia linear e longa, compõem a matriz extracelular e formam um gel que permite a movimentação de moléculas entre as células dos tecidos. O mais conhecido deles é o ácido hialurônico.

Hemostasia – resposta do organismo para parar um sangramento ou hemorragia através da coagulação

Hormônios – substâncias químicas produzidas por glândulas ou órgãos e derivadas de proteínas, aminoácidos ou colesterol, que atuam como sinalizadores em órgãos ou tecidos-alvo, ligando-se a sítios específicos e podem induzir ou inibir uma atividade específica.

Imunomodulatório - substâncias que atuam no sistema imunológico conferindo aumento da resposta orgânica contra determinados microrganismos.

Inflamação - se caracteriza pelos sinais: rubor (vermelhidão), calor, tumor (inchaço), dor e perda de função do tecido inflamado

Leito da ferida – local da ferida

Linfócitos – células de defesa contra infecções

Macrófagos – células responsáveis pela limpeza da pele danificada e destruição de corpos estranhos

Marca-passo - dispositivo de aplicação médica que tem o objetivo de regular os batimentos cardíacos

Matriz extracelular – material localizado entre os tecidos humanos com função de suporte, resistência, tensão e organização estrutural para os tecidos. Composto por glicoaminoglicanos, colágeno, elastina, além de outras proteínas.

Mediadores inflamatórios - moléculas envolvidas na resposta inflamatória aguda, responsáveis por modular os eventos vasculares e celulares ocorridos nesse processo.

Melanina – proteínas pigmentares responsáveis pela cor da pele, dos olhos e dos cabelos, produzidas por células denominadas melanócitos ou melanoblastos.

Não-alérgeno – não provoca alergias ou sensibilidade

Necrose – morte de tecidos, tecido danificado

Neutrófilos – células sanguíneas responsáveis pela defesa contra infecções de fungos ou bactérias

Proteínas – substâncias com estrutura complexa e alto massa molecular, composta por aminoácidos. Atuam na formação e manutenção de tecidos e órgãos

Próteses vasculares – próteses para os vasos sanguíneos

Queratina – proteína estrutural que confere resistência, elasticidade e impermeabilidade à superfície da pele, cabelos e unhas. É produzida pelas células denominadas queratinócitos.

Querato-hialina – proteína que forma uma barreira para impedir a penetração de substâncias na pele e dificultar a desidratação da pele

Reepitelização – renovação celular

Remodelação – fechamento da ferida e formação de cicatriz

Ruptura anatômica – corte, lesão ou ferimento que rompe ou danifica a pele

Ruptura funcional – lesão que impede o funcionamento normal do órgão

Scaffolds – dispositivos médicos de suporte

Stents – próteses inseridas em um conduto do corpo para prevenir ou impedir a redução do fluxo sanguíneo causado por entupimento das artérias.

Substâncias bioativas – substâncias com atividade biológica

Tecido adiposo – camada celular formada por células que acumulam lipídeos em seu interior (adipócitos), modela o corpo, atua no isolamento térmico e acumula energia para o uso no intervalo entre as refeições.

Tecido conjuntivo ou conectivo – tecido da derme formado por fibras elásticas, de colágeno e células, responsáveis pelo processo de cicatrização e renovação da pele

Tecido cutâneo – pele

Teste de Implantação - avalia o efeito local macro e microscópico após implantação cirúrgica do produto.

Teste de sensibilização, irritação ou reatividade intracutânea - verificar o potencial do produto em causar reação de sensibilização ou de alergia em um determinado local

Testes clínicos – testes realizados com seres humanos para determinar a segurança do material testado

Testes *in vitro* – utilizados sem a necessidade de cobaias

Testes *in vivo* – teste com cobaias

Toxicidade aguda, sub-aguda e crônica - Ensaio toxicológico realizado em modelo animal com o objetivo de verificar efeitos adversos da exposição única ou múltipla em um determinado período

Trauma físico - causado por qualquer agente externo como explosões, colisões, causados por objetos cortantes ou pontiagudos, calor, radiação, eletricidade

Trauma químico – causado por agentes químicos

Válvulas cardíacas – localizadas no coração, permitem o bombeamento e fluxo unidirecional do sangue.

Vascularização – presença de vasos sanguíneos

|Anexos

Autorizações de uso dos artigos publicados na tese

← → ↻ 🏠 Seguro | <https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

Copyright Clearance Center **RightsLink®** Home Create Account Help 📧



Title: Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation/deposition into a polyurethane-based wound dressing

Author: C.V. da Silva, V.J. Pereira, P.T.V. Rosa, E.C.M. Cabral-Albuquerque, S.A.B. Vieira de Melo, G.M.N. Costa, A.M.A. Dias, H.C. de Sousa, M.E.M. Braga

Publication: The Journal of Supercritical Fluids

Publisher: Elsevier

Date: September 2016

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

LOGIN

If you're a [copyright.com user](#), you can login to RightsLink using your [copyright.com](#) credentials. Already a [RightsLink user](#) or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

← → ↻ 🏠 Seguro | <https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

Copyright Clearance Center **RightsLink®** Home Create Account Help 📧



Title: Supercritical solvent impregnation/deposition of spilanthol-enriched extracts into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing

Author: C.V. da Silva, V.J. Pereira, G.M.N. Costa, E.C.M. Cabral-Albuquerque, S.A.B. Vieira de Melo, H.C. de Sousa, A.M.A. Dias, M.E.M. Braga

Publication: The Journal of Supercritical Fluids

Publisher: Elsevier

Date: March 2018

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

LOGIN

If you're a [copyright.com user](#), you can login to RightsLink using your [copyright.com](#) credentials. Already a [RightsLink user](#) or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

UFBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA

CEP: 40.210-630

Telefone: (71) 3283-9800

E-mail: pei@ufba.br

Home page: <http://www.pei.ufba.br>

