



UFBA

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

DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

DIEGO ROBERTO DA CUNHA PASCOAL

IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE BIOATIVOS DA
COPAÍBA (*Copaifera sp.*) EM CURATIVOS BIOPOLIMÉRICOS
USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E IMERSÃO
EM DICLOROMETANO



SALVADOR
2020

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

DIEGO ROBERTO DA CUNHA PASCOAL

**IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE BIOATIVOS DA COPAÍBA
(*Copaifera sp.*) EM CURATIVOS BIOPOLIMÉRICOS USANDO CO₂
SUPERCRÍTICO E IMERSÃO EM DICLOROMETANO**

SALVADOR

2020

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

DIEGO ROBERTO DA CUNHA PASCOAL

IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE BIOATIVOS DA COPAÍBA
(*Copaifera sp.*) EM CURATIVOS BIOPOLIMÉRICOS USANDO CO₂
SUPERCRÍTICO E IMERSÃO EM DICLOROMETANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Industrial, tendo a orientação do Prof. Dr. Silvio Alexandre Beisl Vieira de Melo e da Prof.^a Dra. Elaine C. M. Cabral Albuquerque, além da coorientação do Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo e da Dra. Mara Elga Medeiros Braga.

SALVADOR

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Cunha Pascoal, Diego Roberto
IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE BIOATIVOS DA COPAÍBA
(Copaifera sp.) EM CURATIVOS BIOPOLIMÉRICOS USANDO CO₂
SUPERCRÍTICO E IMERSÃO EM DICLOROMETANO / Diego
Roberto da Cunha Pascoal. -- Salvador - Bahia, 2020.
151 f. : il

Orientador: Silvio Alexandre Beisl Vieira de Melo.
Coorientador: Elaine Christine de Magalhães
Cabral Albuquerque.

Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em
Engenharia Industrial) -- Universidade Federal da
Bahia, Escola Politécnica, 2020.

1. impregnação/deposição supercrítica. 2. imersão .
3. copaíba. 4. terpenos. 5. lupeol e ?-cariofileno. I.
Beisl Vieira de Melo, Silvio Alexandre. II. de
Magalhães Cabral Albuquerque, Elaine Christine . III.
Título.

**“IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE BIOATIVOS DA COPAÍBA
(*Copaifera sp.*) EM CURATIVOS BIOPOLIMÉRICOS USANDO CO₂
SUPERCRÍTICO E IMERSÃO EM DICLOROMETANO”**

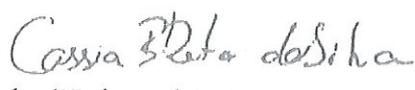
DIEGO ROBERTO DA CUNHA PASCOAL

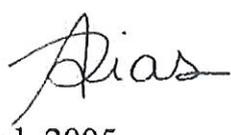
Tese submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Engenharia Industrial.

Examinada por:

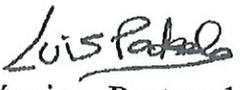
Prof.^a. Dra. Elaine C. M. Cabral Albuquerque (PEI-UFBA) 
Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
Brasil, 2005.

Prof. Dr. Silvio Alexandre Beisl Vieira de Melo 
Doutor em Engenharia Química, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE/UFRJ,
Brasil, 1997.

Prof.^a. Dra. Cássia Britto Detoni (UFRJ) 
Doutora em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
UFRGS, Brasil, 2013.

Dra. Ana Maria Antunes Dias (Universidade de Coimbra, Portugal) 
Doutora em Engenharia Química, pela Universidade de Aveiro, Portugal, 2005.

Dra. Ravenna Lessa Matos (University of Birmingham, UK) 
Doutora em Engenharia Química, pela University of Birmingham, UK, 2020.

Dr. Luis Padrela (University of Limerick, Irlanda) 
Doutor em Engenharia Química, Instituto Superior Técnico, Portugal, 2012.

A minha família e a Mãe Natureza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela energia criadora, que me dá força e me alimenta todas as manhãs, que me sustenta e me faz seguir.

Aos meus pais José e Ana, pelo amor, carinho, incentivo, dedicação e apoio. A minha filha Sofia que é minha inspiração e estrelinha de luz. A Aline, meu Amor, que compartilha comigo todas as batalhas. A minha irmã Daniella por toda ajuda e carinho. A todos os meus familiares pelo carinho, apoio e atenção. Aos meus amigos que me ajudam a estudar e aos que me atrapalham, obrigado por recarregarem as energias.

Aos professores e mestres, Silvio, Elaine, Eudes, Mara, Hermínio e Ana, pela oportunidade ímpar que tive na vida, pelos ensinamentos, pelas discussões, pela paciência, pela atenção e crescimento humano ganho, realmente muito obrigado!

A minha madrinha acadêmica Cinara, que me mostrou os caminhos. A Railda que não vive sem mim. Aos amigos do PEI Julliano, Euclides, Fábio, Tairine, Almir, André, Celso e Mario. Aos meus colegas de trabalho da docência e as alunas de iniciação científica Manoela, Beatriz e Marina. Obrigado pela ajuda. A toda a comunidade de São Lazaro que me acolheu com carinho.

Ao pesquisadores e técnicos de Coimbra do GSP (*Green Sustainable Processes Lab*): Maria João, António, Sofia, Luiza, Rita, Ana, Rui e Sonia pelo acolhimento, amizade e suporte técnico. Aos amigos “tolos” de Portugal. Saudades eternas oh Coimbra!

A todo corpo técnico de laboratórios que foram realizadas as análises experimentais, LBP, LAPEMM, NEEM, IPEFARM, NPPNS, LABCAT, LAPESCA.

À Secretaria do PEI, Tatiane, Tamiles e Robison, pela colaboração e ajuda. A todos os funcionários da UFBA, que zelam por este centro do conhecimento.

Às empresas Ferrosan Medical Devices (Dinamarca) e Systagenix (Estados Unidos), pelas doações dos curativos biopoliméricos SpongostanTM e Promogran[®].

À CAPES pelo suporte financeiro para realização do trabalho (FCT/2650/12/3/2013/S) e pelas bolsas concedidas nos períodos, que estive em Portugal (SFRH/BPD/101048/2014) e no Brasil.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Muito obrigado!

“Cofator da matriz adjunta

A borboleta delicia-se do pólen das flores,
Enquanto eu aprendo sobre ferramentas algébricas,

Essa é nossa diferença,
Ela vive,
Sem se preocupar com a direção do vento,
Mesmo que ele seja o responsável por orientá-la.

Já o meu eu,
Calcula a todo instante o presente,
Passado,
Futuro,
Mas nem mesmo por isso sei,
Pois os valores não são exatos,
Mas apenas uma aproximação da realidade.

Nossa semelhança é que,
Mesmo não compreendendo o que estamos fazendo,
Continuamos a caminhar,
A respirar,
A Sobreviver...”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processos farmacêuticos clássicos, baseados na mistura física.....	32
Figura 2. Processo de impregnação/deposição de bioativos por fusão em biopolímeros	32
Figura 3. Processos de impregnação/deposição de bioativos em matrizes biopoliméricas usando líquido volátil.	33
Figura 4. Processos de impregnação/deposição de compostos bioativos em base biopolimérica via reações.....	34
Figura 5. Na parte superior tem a ilustração da instalação experimental de processo descontínuo do SSI/SSD usando dióxido de carbono, representado pelo cilindro de CO ₂ (1), bomba (2), termostato digital (3), manômetro digital (4), célula de impregnação/deposição (5), banho termostático (6), agitador magnético (7), válvulas (8) e <i>trap</i> (9), enquanto que na parte inferior mostra a impregnação/deposição do bioativo nos poros da matriz polimérica e as principais interações que influenciam o sistema biopolímero/scCO ₂ /bioativo. Fonte: Adaptado de BRAGA et al., 2015; KIKIC; VECCHIONE, 2003; ROSA, 2013)	41
Figura 6. Representação esquemática do sistema de impregnação/deposição, utilizando CO ₂ supercrítico, que é composto por um cilindro de CO ₂ (1), válvulas de alta pressão de agulha (#) e válvulas micrométricas (*) (2), uma bomba condicionada em manta térmica (3), manômetro digital (4), célula de impregnação/deposição (aço inoxidável) para processos de alta pressão dentro de banho termostático de ar (5), agitador magnético (6), termostato digital (7), válvulas de alta pressão de agulha de precisão (#) e válvulas micrométricas (*) (8), vaso coletor do CO _{2(g)} (9).....	57
Figura 7. A) Diagrama de fases do dióxido de carbono. B) Dependência da densidade de CO ₂ com a pressão e a temperatura (Fontes: ATKINS, 2008; CARRILHO et al., 2001).....	58
Figura 8. Rendimento em base seca da extração das folhas de copaíba usando CO ₂ , em função da pressão e da densidade. Isotermas de (▪) 40 °C, (•) 50 °C and (▲) 60 °C (Fonte: BOTELHO et al., 2015).....	59
Figura 9. Copaiba oil loading into commercial wound dressings as a function of scCO ₂ density: impregnation % (A); copaiba oil/polymer ratio (B). Same letters for each density indicate that there is no significant difference compared by the student t-test (p <0.01)	74
Figura 10. Partition coefficient of copaiba loaded into commercial wound dressings as function of scCO ₂ density	78
Figura 11. Quantification of released β-Caryophyllene from processed commercial wound.....	79
Figura 12. Chemical profile of loaded and released copaiba oils from commercial dressings.....	80
Figura 13. FTIR–ATR of the copaiba oil and dressing samples: non-loaded dressings (continuous line) and processed samples (dashed lines). Dressings were represented by Spongostan® and Promogran® processed at 800 kg/m ³ and 900kg/m ³ of scCO ₂ , respectively, both with initial mass of copaiba oil of 200 mg.....	81
Figura 14. Equilibrium water vapor sorption values for Promogran® e Spongostan® dressings	82
Figura 15. SEM micrographs for non-processed and processed commercial dressings processed at 900 kg/m ³ using 200 mg of copaiba oil.....	87
Figura 16. SEM micrographs details of commercial dressings processed at 317 bar and 45 °C, using 200 mg of copaiba oil.	89
Figura 17. Thermal stability of commercial dressings measured at 40 and 45 °C	89
Figura 18. Solubility and refractive index assays of copaiba oleoresin and leaf extract in hexane and dichloromethane	105
Figura 19. Chemical structure profile of copaiba oleoresin obtained by GC–MS with name of compounds and area % into brackets	106
Figura 20. Chemical structure profile of copaiba leaf extract obtained by GC–MS with name of compounds and area % into brackets	106
Figura 21. Copaiba leaf extract and oleoresin incorporated into 3D matrix dressings: impregnation yield (A) and copaiba mass (leaf-extract or oleoresin)/ polymer ratio (B).....	109

Figura 22. Infrared spectra of non-impregnated 3D matrix, copaiba oleoresin and incorporated oleoresin 3D matrix (A), and non-impregnated 3D matrix, copaiba leaf extract, and incorporated leaf extract 3D matrix (B)	112
Figura 23. SEM micrographs of non-impregnated 3D matrix dressings at 50×, 100× and 350× magnifications, and SEM of impregnated 3D matrices at 50×, 350× and 2000× magnifications.....	115
Figura 24. SEM micrographs for non-processed and processed 3D matrix dressings with DCM and HXN organic solvent at 100× magnification	116
Figura 25. 13C NMR spectral of copaiba oleoresin (A) and 13C NMR spectral of copaiba oleoresin impregnated 3D matrix (B) recorded at 500 MHz with a room temperature probe	118
Figura 26. 13C NMR spectral of copaiba leaf extract (A) and 13C NMR spectral of copaiba leaf extract impregnated 3D matrix (B) recorded at 500 MHz with a room temperature probe.....	119
Figura 27. Thermogravimetric curve (TG) and first derivative thermogravimetric curve (DTG) of 3D, copaiba leaf extract and oleoresin samples	120
Figura 28. Thermogravimetric curve (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) of 3D, 3D + leaf extract and 3D + oleoresin	121
Figura 29. Classificação dos principais solventes orgânicos utilizados nas indústrias. Fonte: Adaptado de GRODOWSKA; PARCZEWSKI, 2010.....	146
Figura 30. Montagem da célula de impregnação do SSI/SSD, onde mostra em (a) os curativos biopoliméricos comerciais; (b) amostra de 1 cm ² do curativo; (c) amostras expostas a UR de 20 % por 24 horas; (d) adição do oleoresina; (e) célula de aço inox de impregnação onde o biopolímero esta na parte superior e o oleoresina na parte inferior. Logo após a célula de impregnação foi colocada em banho termostático.	147
Figura 31. Atividade antimicrobiana da oleoresina e do extrato das folhas de copaíba apresentando os halos de inibição do crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro (mm), frente aos microrganismos <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> . Em (A) mostra o resultado do halo de inibição usando 4 mg de oleoresina, em (B) mostra o halo de inibição de 4 mg de extrato da folha, ambos contra as cepas de <i>S. aureus</i> . Enquanto em (C) mostra o halo de inibição de 8 mg de oleoresina e em (D) o halo de inibição de 8 mg de extrato de folhas, ambos contra a <i>E. coli</i> . Os valores dos halos são apresentados na Tabela 4	148
Figura 32. Sistema de impregnação/deposição usando fluido supercrítico (SSI/SSD), formado por um manômetro digital (1), termostato digital (2), célula de impregnação/deposição (aço inoxidável) para processos de alta pressão dentro de banho termostático de ar (3), agitador magnético (4), válvulas de alta pressão de agulha de precisão (5) e válvula micrométrica (6).....	149
Figura 33. Curva de calibração do β-Cariofileno pelo método de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama.....	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Chemical profile of copaiba resin oil obtained by GC-MS.....	77
Tabela 2. Thermal analyses of processed and of non-processed dressings and copaiba oil	83
Tabela 3. Physical properties of non-processed commercial wound dressings and processed by scCO ₂	84
Tabela 4. Diameter of bacteria growth inhibition halo showed for disks impregnated with copaiba oleoresin or leaf extract. Values obtained from five replicates.	104
Tabela 5. Experimental 13C NMR spectra signal data from copaiba free oleoresin, 3D matrix-impregnated oleoresin, and free leaf extract and 3D matrix-leaf extract. The literature data obtained from Bohlmann et al., 1980 [60] ^a , da Silva et al., 2013 [61] ^b , Carvalho et al., 1998 [62] ^c , and Luz et al., 2010 [63] ^d	108
Tabela 6. FTIR chemical profile of copaiba free oleoresin, 3D matrix-impregnated oleoresin (3D + oil), and free leaf extract and 3D matrix-leaf extract (3D + leaf)	111
Tabela 7. Thermal analysis of 3D matrix, copaiba oleoresin and leaf extract. The maximum temperature of all events was retrieved in °C. All values obtained from duplicates	113
Tabela 8. Average normal deformation of 3D matrix dressing processed by immersion method in HXN and DCM without copaiba compounds	114

Tabela 9 – Exemplos de trabalhos publicados sobre de incorporação de produtos naturais em matrizes poliméricas, utilizando métodos clássicos e o SSI/SSD..... 151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LETRAS LATINAS

- b – Afinidade do orifício do polímero
 C – Concentração do fluido
 C' – Constante de saturação do orifício do polímero
 CO_2 – Dióxido de carbono
 D – Coeficiente de difusão
 DA – Grau de acetilação (*Degree of acetylation*)
 F – Taxa de transferência de massa
 M – Massa
 MW – Massa molecular (*molecular weight*)
 P – Pressão
 P_C – Pressão crítica
 R – Constante universal dos gases perfeitos
 S – Solubilidade
 T – Temperatura
 T_C – Temperatura crítica
 UR – Umidade relativa do ar

LETRAS GREGAS

- α – Soma de entalpia de vaporização e solvatação dividida pela constante universal dos gases perfeitos
 β – Constante relacionada aos pesos moleculares do soluto e solvente
 κ – Número associado
 k_D – Coeficiente de solubilidade

ABREVIATURAS

API – Ingredientes farmacêuticos ativos (*Active Pharmaceutical Ingredients*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

FDA – Administração de fármacos e alimentos (*Food & Drug Administration*)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial

scCO₂ – Dióxido de carbono no estado supercrítico

SFE – Extração por Fluido Supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*)

SSI/SSD – Impregnação por Solvente Supercrítico/ Deposição por Solvente Supercrítico
(*Supercritical Solvent Impregnation/ Supercritical Solvent Deposition*)

SVA – Sorção de vapor de água

UNIDADES

°C – Celsius

Kg – quilograma

m – metro

mg – miligrama

min – minuto

nm – nanômetro

Pa – Pascal

ppm – partes por milhão

s – segundos

PASCOAL, Diego Roberto da Cunha. IMPREGNAÇÃO/DEPOSIÇÃO DE BIOATIVOS DA COPAÍBA (*Copaifera sp.*) EM CURATIVOS BIOPOLIMÉRICOS USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO E IMERSÃO EM DICLOROMETANO. 2020 (Tese de doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Industrial. Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Os curativos poliméricos são usados no tratamento de feridas crônicas e agudas, destacando-se os que são impregnados/depositados com compostos bioativos de plantas medicinais em substituição aos fármacos sintéticos, com menor efeito colateral ao paciente. As impregnações/deposições de bioativos em matrizes poliméricas são realizados por diferentes métodos, que têm em comum o uso intensivo de solventes orgânicos e um número excessivo de etapas do processo. Alternativamente, a impregnação/deposição supercrítica, realizada com dióxido de carbono a elevadas pressões, apresenta algumas vantagens como a rapidez no processamento, a eliminação do uso de solventes orgânicos e a secagem do produto ao final do processo. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade técnica dos processos de impregnação/deposição de compostos bioativos da copaíba, em 2 curativos comerciais biopoliméricos: SpongostanTM e Promogran[®]. O método de impregnação/deposição supercrítica (SSI/SSD) com dióxido de carbono e o método clássico por imersão em solvente orgânico foram utilizados e comparados. No método SSI/SSD, quanto maior a pressão e a densidade do solvente, maior o rendimento de oleorresina impregnada/depositada por biopolímero. Observou-se que a SpongostanTM sofreu alterações na área superficial, quando processada a pressões elevadas. A solubilidade da oleorresina no solvente supercrítico foi o fator de maior influência, para o rendimento do processo, relacionado ao aumento de pressão do sistema. Os compostos terpênicos (bioativos da oleorresina) foram detectados nos dois curativos impregnados/depositados. O método de impregnação/deposição clássica por imersão usou o solvente orgânico diclorometano, e nesse método o extrato das folhas e a oleorresina de copaíba foram impregnados/depositados no curativo SpongostanTM. Os resultados dos bioativos impregnados/depositados foram promissores tanto para o extrato de folhas, quanto da oleorresina no biopolímero. Os compostos bioativos da copaíba foram identificados nos curativos impregnados/depositados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. O extrato das folhas e a oleorresina apresentaram atividades antibacterianas, obtendo inibição de crescimento bacteriano de Gram-positiva e Gram-negativa. Em ambos métodos de impregnação/deposição, as estruturas porosas dos curativos foram preservadas. Além disso, observou-se em micrografias que a oleorresina de copaíba teve uma distribuição superficial homogênea nos diferentes biopolímeros independentemente do tipo de método. Os resultados revelam que a solubilidade dos compostos bioativos da copaíba, nos diferentes solventes usados nos processos (dióxido de carbono supercrítico e diclorometano) são fundamentais para o sucesso e viabilidade técnica da impregnação/deposição de compostos bioativos em matrizes biopoliméricas. O método SSI/SSD usando CO₂ supercrítico mostrou vantagens em relação ao método por imersão usando diclorometano, porque permitiu o controle das quantidades do bioativo impregnado/depositado, através de ajustes finos na pressão e temperatura, além de evitar a presença de solvente orgânico residual na matriz biopolimérica.

PALAVRAS-CHAVE: Impregnação/Deposição supercrítica, imersão, terpenos, lupeol, β -cariofileno, copaíba

ABSTRACT

Polymeric dressings are used in the treatment of chronic and acute wounds, especially those that are impregnated/deposited with bioactive compounds from medicinal plants to replace synthetic drugs, with less side effect to the patient. The impregnations/depositions of bioactive in polymeric matrices carried out by different methods, which have in common the intensive use of organic solvents and an excessive number of process steps. On the other hand, the supercritical impregnation/deposition, carried out with carbon dioxide at high pressures, has some advantages such as speed in processing, the elimination of the use of organic solvents and the drying of the product at the end of the process. In this context, the present work aimed to study the technical feasibility of the impregnation/deposition processes of bioactive compounds from copaiba, in 2 biopolymeric commercial dressings: SpongostanTM and Promogran[®]. The supercritical impregnation/deposition method (SSI/SSD) with carbon dioxide and the classic method by immersion in organic solvent were used and compared. In the SSI/SSD method, the higher the pressure and density of the solvent, the greater the yield of oleoresin impregnated/deposited into biopolymer. It was observed that SpongostanTM underwent changes in the surface area, when processed at high pressures. The solubility of oleoresin in the supercritical solvent was the factor of greatest influence, for the process yield, related to the increase in system pressure. The terpenic compounds (bioactives of oleoresin) were detected in the two impregnated/deposited dressings. The classic impregnation/deposition method by immersion used the organic solvent dichloromethane, and in this method the leaf extract and oleoresin from copaiba were impregnated/deposited in the SpongostanTM dressing. The results of the impregnated/deposited bioactives were promising for both leaf extract and oleoresin in the biopolymer. The bioactive compounds of copaiba were identified in the impregnated/deposited dressings by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Leaf extract and oleoresin showed antibacterial activities, obtaining inhibition of Gram-positive and Gram-negative bacterial growth. In both methods of impregnation/deposition, the porous structures of the dressings were preserved. In addition, it was observed in micrographs that the copaiba oleoresin had a homogeneous surface distribution in the different biopolymers regardless of the type of method. The results reveal that the solubility of the bioactive compounds of copaiba, in the different solvents used in the processes (supercritical carbon dioxide and dichloromethane) are fundamental for the success and technical viability of the impregnation/deposition of bioactive compounds into biopolymer matrices. The SSI/SSD method using supercritical CO₂ showed advantages than immersion method using dichloromethane, because it allowed the control of the amounts of the impregnated/deposited bioactive, through fine adjustments in pressure and temperature, in addition to avoiding the presence of residual organic solvent in the biopolymer matrix.

KEYWORDS: Impregnation/Deposition supercritical, immersion, terpenes, lupeol, β -caryophyllene, copaiba

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	16
1. Introdução	17
1.2. Organização do trabalho	20
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. Introdução	23
2.2. Curativos no processo de cicatrização de feridas	23
2.3. Curativos poliméricos impregnado/depositados com APIs, sintéticos ou substâncias bioativas de produtos naturais	27
2.4. Processos de impregnação/deposição de substâncias ativas em curativos biopoliméricos	30
2.4.1 Métodos de impregnação/deposição de substâncias bioativas a baixa pressão em materiais biopoliméricos	31
2.4.2 Substâncias bioativas da copaíba (<i>Copaifera sp.</i>) impregnadas/depositadas em matrizes poliméricas	35
2.4.3 Métodos de impregnação/deposição de substâncias bioativos em matrizes biopoliméricas usando dióxido de carbono supercrítico	38
CAPÍTULO 3. METODOLOGIA	50
3.1. Introdução	51
3.2. Material	51
3.3. Obtenção de extrato hexânico das folhas de <i>Copaifera luetzelburgii</i> e caracterização fitoquímica	51
3.4. Ensaio antibacteriano com extrato hexânico das folhas de <i>Copaifera luetzelburgii</i> e oleorresina da copaíba	52
3.5. Solubilidades do oleorresina e do extrato hexânico de folha de <i>Copaifera luetzelburgii</i> em solventes orgânicos	54
3.6. Método clássico de impregnação/deposição usando líquido volátil, dos bioativos da copaíba em base biopolimérica	54
3.7. Métodos de impregnação/deposição SSI/SSD de bioativos da copaíba em bases biopoliméricas	55
3.8. Caracterização físico-química das amostras	60
3.9. Caracterização do extrato de folha e oleorresina impregnado/depositado	62
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Introdução	66
Copaiba Oil-loaded Commercial Wound Dressings Using Supercritical CO ₂ :	67
A Potential Alternative Topical Antileishmanial Treatment	67

Bioactives Compounds of <i>Copaifera sp.</i> Impregnated into Three-Dimensional Gelatin Dressings	94
CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES	126
CONCLUSÃO	127
Sugestões para Trabalhos Futuros	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
APÊNDICE	145
Lista de Publicações	145
ANEXOS	146

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os polímeros são os materiais mais utilizados na cobertura dos curativos comerciais de cicatrização de feridas, podendo ser naturais à base de quitosana, alginato, gelatina, ácido hialurônico, celulose, colágeno, ou sintéticos como o poliuretano, que são facilmente encontrados. Os curativos poliméricos modernos têm buscado ir além da função de cobertura para as feridas, oferecendo também funções de atividades biológicas nos tecidos injuriados, como desbridamento, absorção de exsudato e a entrega de moléculas bioativas diretamente na região lesionada, destacando a ação anti-inflamatória e antibacteriana. Essas substâncias são incorporadas nas matrizes poliméricas por diferentes processos. Sendo assim, a afinidade química da tríade polímero-bioativo-processo é determinante para viabilidade de produção de curativos impregnado/depositados com bioativos. Curativos de última geração são promissores para a cicatrização dos tecidos, pois a eficiência do tratamento da pele necessita de uma resposta anti-inflamatória rápida do organismo, para evitar a inflamação crônica, a perda da função e a formação de fibrose (BOATENG & CATANZANO, 2015; GOYAL et al., 2016; HOMAEIGO HAR & BOCCACCINI, 2020).

Os sistemas poliméricos dos curativos de última geração apresentam versatilidade estrutural, podendo ser dos tipos filme, espuma e gel. Os polímeros podem ser biopolímeros, sintéticos ou híbridos. Os biopolímeros são comumente usados para curativos por serem biocompatíveis, destacando-se os biodegradáveis, ou seja, compostos de material orgânico com mínima resposta biológica ao paciente e fácil decomposição (BOATENG et al., 2008; DIAS et al., 2013). Variáveis dos polímeros como tamanho, forma e carga de bioativos incorporada favorecem a formação de sistemas matriciais de liberação de fármacos. Esses sistemas são capazes de liberar os fármacos em concentrações controladas, na qual a cinética de liberação é influenciada por propriedades do polímero, assim como pelo grau de inchaço, densidade de reticulação e taxa de degradação. Além disso, a estrutura tridimensional favorece a estrutura de suporte, para o desenvolvimento da matriz extracelular do tecido (BRAGA et al., 2008; KLANGJORHOR et al., 2012; LOPES, LOBO & COSTA, 2005; SCHIERHOLZ et al., 1997; K. WU et al., 2016).

Os sais de prata e os fármacos sintéticos são as substâncias mais comuns, incorporadas em curativos poliméricos comerciais, que possuem funções: analgésica, anti-inflamatória e antibacteriana. Porém, o uso indiscriminado da antibioticoterapia (administração inadequada de antibióticos) tem provocado o surgimento de bactérias multirresistentes. Diante do problema,

a Organização Mundial de Saúde lançou, em 2017, uma lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos. Essa lista foi desenvolvida para promover e orientar a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos. Assim, as substâncias bioativas derivadas de plantas, como os metabólitos secundários, têm-se destacado como uma alternativa para impregnação/deposição de compostos bioativos com ações anti-inflamatórias e/ou antibacterianas em matrizes poliméricas, principalmente nos biopolímeros, para serem aplicadas em tratamentos de cicatrização de feridas (OPAS, 2017; SARQUIS et al., 2019; SILVA et al., 2018). O salicitalo de metila é um exemplo de composto bioativo extraído de plantas medicinais, usado como medicamento impregnado/depositado em base polimérica, sendo comercializado como adesivo tópico, para dores musculares com ação analgésica e anti-inflamatória.

Existem diferentes métodos de impregnação/deposição de substância bioativos em curativos poliméricos. Os processos clássicos de impregnação/deposição, em geral realizados à pressão atmosférica, conseguem incorporar doses significativas para aplicações terapêuticas, podem ser realizados por deposição superficial, misturas (fusão, vazamento/evaporação do solvente, mistura física), reações (polimerização, reticulação, sol-gel ou enxerto) ou imersão em solventes orgânicos. Algumas desvantagens desses métodos estão relacionadas à heterogeneidade dos bioativos impregnados/depositados no polímero, à baixa seletividade e às limitações ao uso de solventes orgânicos. Os compostos bioativos incorporados durante a síntese podem ser degradados nas condições de processo utilizadas (acidez, temperatura, etc). Em geral, os métodos clássicos de impregnação/deposição por imersão utilizam solventes orgânicos, que apresentam altas toxicidades, são inflamáveis e deixam resíduos no produto final. Assim, é necessário desenvolver métodos capazes de superar essas desvantagens (BRAGA et al., 2015, DIAS et al., 2013; SILVA et al., 2016).

O método de impregnação/deposição supercrítica (*Supercritical Solvent Impregnation/Supercritical Solvent Deposition* - SSI/SSD), usando como solvente o dióxido de carbono no estado supercrítico, tem sido uma alternativa aos processos clássicos, por apresentar afinidade química pelas substâncias bioativas, condições brandas de temperatura evitando a degradação de compostos termossensíveis, além da possibilidade de eliminação do uso de solventes orgânicos em processo de impregnação/deposição em polímeros (BUENO et al., 2016; COSTA et al., 2010). O SSI/SSD controla as concentrações de compostos bioativos impregnados/depositados, manipulando a solubilidade e difusividade dos biocompostos através

de ajustes finos das variáveis do sistema, como temperatura, pressão, densidade do solvente, concentração inicial dos compostos bioativos, taxa de despressurização e tempo de impregnação/deposição. Além disso, o solvente supercrítico pode ser recuperado em sistema fechado e reutilizado em novo processo de impregnação/deposição, minimizando impactos ambientais e econômicos na escala de produção industrial (AMERI et al., 2020; BASTANTE et al., 2017; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2017; SILVA et al., 2018). O dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) é utilizado no SSI/SSD por apresentar vantagens como baixo custo, baixa toxicidade, capacidade de inchamento da matriz polimérica, e temperatura e pressão críticas moderadas, além de ser inerte. O scCO₂ é responsável por dissolver o composto bioativo presente na célula de impregnação/deposição, e transportá-lo para a superfície e interior das cadeias biopoliméricas do curativo. Em geral, a maioria dos processos são em sistemas estáticos (AMERI et al., 2020; DIAS et al., 2013; KIKIC & VECCHIONE, 2003; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2017). Adicionalmente, o SSI/SSD é capaz de dispersar homogênea as moléculas bioativas na matriz polimérica, aumentando a interação entre o curativo e as substâncias bioativas, ampliando a área de contato entre os agentes terapêuticos impregnado/depositados e a ferida (DIAS et al., 2011; GOÑI et al., 2017).

No Brasil, bioativos da copaíba (*Copaifera sp.*) têm recebido atenção devido as suas reconhecidas atividades terapêuticas como: anti-inflamatória, antibacteriana, cicatrização de feridas, antitumoral, anti-psoriática e anti-leishmania (ESTEVÃO et al., 2013; GELMINI et al., 2013; LIMA et al., 2003; MORELLI et al., 2015; PAIVA et al., 2002; SANTOS et al., 2013). O oleorresina retirada do tronco, o extrato de folhas e a polpa de fruta são as partes da copaíba que possuem substâncias bioativas de baixa polaridade (hidrofóbicas), com reconhecidas atividades terapêuticas, de diferentes classes, destacando-se os terpenos e os flavonoides (BARBOSA et al., 2013; LEMOS et al., 2015; SANTIAGO et al., 2015). Porém, na forma livre, tais bioativos possuem obstáculos para manter suas atividades biológicas, uma vez que apresentam-se insolúveis em meio aquoso, susceptíveis à oxidação química, além de composição heterogênea dos metabólicos secundários das diferentes espécies, que são causados por fatores ambientais ou genéticos (BARBOSA et al., 2013; LIMA et al., 2003). Para isso, é necessário desenvolver métodos capazes de solucionar essas dificuldades de processamento do óleo e manter suas ações biológicas no produto. Uma alternativa é a impregnação/deposição de bioativos do oleorresina de copaíba em matrizes poliméricas, uma vez que essa incorporação protege os bioativos dos fatores ambientais evitando a fotodegradação, oxidação e outras reações indesejáveis (MUSTAPA et al., 2016).

Capítulo 1. Introdução

Diante o exposto, este trabalho buscou investigar comparativamente dois métodos de impregnação/deposição de bioativos hidrofóbicos voláteis do oleorresina e do extrato de folhas da copaíba em curativos biopoliméricos, (à base de gelatina e de colágeno/celulose regenerada). O primeiro método usou o dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) como solvente, enquanto o segundo método foi a impregnação/deposição clássica, usando diclorometano como solvente orgânico. Buscou-se entender como controlar as quantidades de compostos bioativos impregnado/depositados nos curativos biopoliméricos, através de ajustes das variáveis dos métodos de impregnação/deposição. Além disso, foram estudadas as condições de processamento para reduzir a oxidação da oleorresina de copaíba e/ou do curativo, visando preservar suas ações biológicas, e evitando alterações prejudiciais às funções biomecânicas dos curativos. Foram escolhidos os curativos biopoliméricos comerciais de gelatina (SpongostanTM) e colágeno e celulose regenerada (Promogran[®]), tendo em vista a não existência de relatos na literatura sobre a impregnação/deposição de óleo de copaíba nos mesmos.

1.2. Organização do trabalho

O capítulo 2 aborda os principais assuntos que fundamentam o estado da arte, com o objetivo de construir o pilar do conhecimento científico e o desenvolvimento da pesquisa nos moldes acadêmicos. Dentro do trabalho realizado, os principais temas para fundamentação do estado da arte foram: i) o uso dos curativos poliméricos nos tratamentos de cicatrização de feridas em tecidos; ii) os curativos biopoliméricos como matriz transportadora de compostos bioativos; iii) processos de impregnação/deposição de bioativos por métodos clássicos usando solventes orgânicos; iv) os compostos bioativos da copaíba impregnados/depositados em matrizes poliméricas; v) os diferentes métodos de impregnação/deposição supercrítico.

O capítulo 3 apresenta o material utilizado na pesquisa e os métodos, para produzir e caracterizar os curativos biopoliméricos impregnado/depositados com compostos bioativos da copaíba, extrato de folha e oleorresina de copaíba, usando sistemas a alta pressão e baixa pressão, sendo estes: o SSI/SSD usando scCO₂ e o método de impregnação/deposição por imersão em solvente orgânico (diclorometano). Assim, foi explicitada a metodologia adotada para realização experimental do projeto.

Capítulo 1. Introdução

O capítulo 4 apresenta os resultados e discussão dos experimentos realizados durante o doutoramento. Os resultados foram compilados em dois artigos científicos. O primeiro artigo, intitulado “*Copaiba Oil-loaded Commercial Wound Dressings Using Supercritical CO₂: A Potential Alternative Topical Antileishmanial Treatment*”, utilizou o SSI/SSD para impregnar oleorresina em curativos de gelatina e colágeno/celulose regenerada. O segundo artigo, intitulado “*Bioactives Compounds of Copaifera sp. Impregnated into Three-Dimensional Gelatin Dressings*”, utilizou o método de impregnação/deposição por imersão usando diclorometano, para incorporar compostos bioativos de extrato de folhas (*Copaifera lutezelburgii*) e oleorresina da copaíba em curativo de gelatina. Os trabalhos foram submetidos e publicados em revistas científicas indexadas.

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 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução

Neste capítulo são apresentados os fundamentos teóricos relacionados ao tema da tese, descrevendo as vantagens e os problemas associados à utilização de diferentes curativos poliméricos, no processo de cicatrização de feridas. Além disso, são descritos os curativos biopoliméricos impregnados/depositados com bioativos de produtos naturais. Na sequência, são apresentados os tipos de processos de impregnação/deposição de bioativos em matrizes poliméricas dos processo clássico a baixas pressões, sendo descritos os processos realizados com compostos bioativos da copaíba. E finalizando, os processos de impregnação/deposição de bioativos usando $scCO_2$.

2.2 Curativos no processo de cicatrização de feridas

O uso de curativos faz parte de um conjunto de cuidados dispensados a uma ferida ou a um ferimento, visando proporcionar segurança e conforto ao paciente e favorecer a cicatrização. A eficiência de cicatrização de feridas, com o uso de curativos, está condicionada aos seguintes requisitos: ser impermeável à água e outros fluidos, permitir as trocas gasosas (oxigênio e vapor de água); ser de fácil aplicação e remoção, não causar traumas; auxiliar na hemostasia, interrompendo o sangramento ou hemorragia; proteger a ferida contra traumas mecânicos e contra infecções; limitar o movimento dos tecidos ao redor da ferida; tratar as cavidades existentes na ferida; promover o desbridamento; aliviar a dor; proporcionar condições favoráveis às atividades diárias do paciente; remover o exsudato; manter alta umidade na interface entre ferida e o curativo; ser impermeável às bactérias; proporcionar isolamento térmico; não possuir partículas nem substâncias tóxicas ou contaminadas provenientes das feridas; além de, permitir a remoção sem causar traumas locais (BRASIL, 2008; DIAS et al., 2013; MOURA et al., 2013). Os curativos podem ser produzidos para ter contato direto e permanente com a ferida ou contato indireto, devido à presença de uma camada secundária ou cobertura adicional sobre a matriz estrutural (BRASIL, 2008).

No Brasil, o registro ou o cadastramento dos curativos são regularizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e sua comercialização e desenvolvimento têm que atender às exigências do regulamento técnico de produtos médicos (RDC nº 185/2001). Além disso, a ANVISA desenvolve manuais técnicos para registro de implantes ortopédicos e de

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

equipamentos médicos, buscando contribuir para o desenvolvimento da produção, comercialização e uso seguro de biomateriais no país (ABDI, 2011; BRASIL, 2001). Estima-se que o mercado global dos curativos para a pele será de US \$ 20,4 bilhões até 2021, representando um segmento crucial da indústria de tratamento de feridas (HOMAEIGO HAR & BOCCACCINI, 2020). Os tratamentos usando curativos poliméricos consolidaram-se nos últimos 30 anos, com um crescimento exponencial no mercado, onde o número de curativos passou de 4 para 262 na *Drug Duff*, que é a secretaria de saúde do Reino Unido.

Diferentes materiais poliméricos, sintéticos ou naturais (biopolímeros), são usados em cobertura primária e secundária de curativos podendo ser apresentados nas formas de placa, fita, fibra, pasta, gel, grânulos e pó (BOATENG *et al.*, 2008). A escolha do material dos curativos poliméricos é importante na eficácia do tratamento clínico. Diferentes materiais são usados em curativos biopoliméricos, a maioria à base de polissacarídeos, em geral derivados da celulose (metilcelulose, hidroxipropilcelulose e carboximetilcelulose), alginatos ou de proteínas (colágeno, gelatina) (ALTIOK *et al.*, 2010; BRAGA *et al.*, 2008; BOATENG *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2013; PIRES; AOUADA, 2016; WU *et al.*, 2016; YUDANOVA; RESHETOV, 2006).

Os curativos à base de polissacarídeos e proteínas têm propriedades intrínsecas que são atrativas para o processo de cicatrização de feridas, como biocompatibilidade e capacidade de inchamento, removendo os exsudados da ferida. Alguns ainda possuem a propriedade de biodegradabilidade, ou seja, as células humanas produzem enzimas capazes de metabolizar e quebrar as ligações químicas desses biopolímeros, gerando produtos de degradação não tóxicos ao organismo humano, sendo absorvíveis pelo corpo, não exigindo sua remoção da ferida. Além disso, os curativos biopoliméricos necessitam ter *design* adequado para reprodutibilidade de processamento e para área lesionada, causando o mínimo de inconveniência para o paciente, além de baixa taxa de proliferação de microrganismos e custo razoável (BOATENG *et al.*, 2008; YUDANOVA; RESHETOV, 2006).

O curativo biopolimérico mais comum é o de gaze umedecida, em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9 %. Seu mecanismo de ação preserva a umidade na ferida, favorecendo as etapas de regeneração do tecido envolvidas no processo de cicatrização (migração, inflamação e reepitelização) através da proteção da área lesionada. É indicado para tratamento de todos os tipos de feridas e não tem contraindicações. No entanto, estudos mostraram que possui alto custo e necessita de trocas periódicas, pois foram 7 trocas de curativos por semana,

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

enquanto para os curativos úmidos foram 3 por semana e para curativos de biocelulose 1,4 por semana. A celulose, apesar de ser um biopolímero biocompatível, não é biodegradável, pois o corpo humano não é capaz de hidrolisar enzimaticamente esse composto orgânico (MOURA et al., 2013; SCHMITZ et al., 2014).

Apesar de muitos materiais biopoliméricos serem usados em cobertura primária de curativos, os biodegradáveis têm se destacado por suas propriedades de rápida decomposição. A gelatina é um desses biomateriais, sendo um polipeptídeo hidrossolúvel extraído por desnaturação parcial ácida (Tipo A), alcalina (Tipo B) ou enzimática de colágeno. As principais fontes desse biomaterial são matéria-prima animal, peles e ossos de origem porcina. O curativo à base de gelatina é absorvente estéril e possui propriedade hemostática, auxiliando na suspensão do sangramento ou hemorragia da ferida. Além disso, pode ter estrutura porosa, tipo espuma, ou que pode atuar como suporte semelhante à matriz extracelular. A sua biomecânica tridimensional favorece a sua utilização como curativo de preenchimento e para regeneração de tecidos. Também pode ser encontrado no tipo filme associado a outros polímeros (sintéticos), como o polietilenoglicol. A gelatina possui propriedades de baixa toxicidade e baixo teor antigênico, ou seja, não estimula a produção de anticorpos (ANDERS et al., 2009; WU K., 2016; ZAMAN et al., 2011). Pode-se encontrar esse tipo de curativo comercializado pelas marcas Spongostan[®], Gelfoam[®], Hemospon[®].

O colágeno é outro importante biopolímero biodegradável, sendo uma proteína encontrada nas matrizes extracelulares dos tecidos humanos. É biossintetizado por células de fibroblastos e, quando usado nas coberturas de curativos, estimula a produção de novos tecidos e a higienização da ferida. Possui propriedades biomecânicas atrativas, como degradação e absorção de água. A organização da cadeia polimérica linear confere ao biopolímero uma boa resistência para tratamento de feridas. Apesar disso, os curativos de colágeno são restritos em aplicações cirúrgicas, pois possuem baixa resistência mecânica à dissolução em alto fluxo sanguíneo. Em geral, não possuem propriedades adesivas suficientes para servir a qualquer propósito prático na estagnação do fluxo sanguíneo grave. Eles também são suscetíveis à dissolução em sangramento hemorrágico. Essa dissolução e o colapso desses curativos podem ser catastróficos, havendo a possibilidade de perda de adesão à ferida e permitir que o sangramento continue inabalável (BOATENG et al., 2015; MOURA et al., 2013; SILVA et al., 2018; ZAMAN et al., 2011). Esse tipo de curativo pode ser encontrado comercialmente nas marcas Promogran[®], Dermadry[®], Fibracol[®], entre outros.

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

O alginato é um polissacarídeo encontrado em algumas algas marinhas, ácidos gulurônicos e manurônicos, e as suas fibras são utilizadas para curativos biopoliméricos. Seu mecanismo de ação, nas feridas, é através da absorção de líquidos, sendo capaz de realizar a hemostasia, interromper o sangramento ou hemorragia. Através de sua trama de fibras realiza a retenção de bactérias imobilizando-as. A interface de contato, entre o curativo e a ferida, fica úmida, proporcionando troca iônica de cálcio do biopolímero e íons de sódio da ferida, transformando as fibras de alginato em textura gel, não aderente fibrinoso, deixando o meio úmido, ideal para a cicatrização (BOATENG et al., 2008; BRASIL, 2008). Esse tipo de curativo é vendido pelas marcas Biatain[®], Fibracol[®] e Casex[®].

Entre os polímeros sintéticos se destacam os hidrocolóides, que são compostos por partículas hidrofílicas, derivados da celulose natural, que se transformam em gel, em contato com o exsudato da ferida. Em geral sua composição é de carboximetilcelulose sódica, pectina e gelatina, podendo ter face externa com película de poliuretano semipermeável (placa), e proporcionam barreira de proteção contra contaminantes externos e bactérias. No formato de fita, fibra, pasta, gel, grânulos e pó, o intumescimento das partículas de celulose faz elas expandirem e cria um ambiente úmido, possibilitando a remoção de células desvitalizadas e regeneração do tecido (desbridamento autolítico). Porém, esse polímero sintético possui a desvantagem por ser impermeável ao oxigênio, tornando-o contraindicado em casos de infecção por microrganismos anaeróbicos e em casos com excessiva drenagem, por causa da limitação de absorção líquida (BOATENG, 2008).

Os hidrocolóides, em placas, são indicados para curativos de feridas com pequena ou moderada secreção, enquanto os hidrocolóides em forma de fibra, pasta, pó, grânulos, pó e fita são indicados para feridas profundas, podendo preencher todos os espaços da região lesionada. Enquanto as formas em gel, pasta e placa podem ser utilizados em feridas cirúrgicas, traumáticas, por pressão, feridas venosas, áreas necróticas ressecadas (escaras) e em áreas doadoras de enxertos de pele. Os hidrocolóides possuem resistência mecânica que possibilita seu uso no local da ferida durante alguns dias, porém não são absorvíveis pelo organismo exigindo sua remoção da ferida. Assim, uma desvantagem desse material é seu odor, que pode ser desagradável no momento de remoção e a sensibilidade que pode ser causada por adesivos presentes nas bordas com fitas adesivas. Além disso, esse material possui cor opaca e dependendo da espessura pode dificultar a visualização da região ferida. Pode ser encontrado comercializado pelas marcas Brava[®], Cremer[®], Comfeel[®], Adapt[®], Curatec[®], entre outras (BOATENG et al., 2008).

O poliuretano é outro importante curativo polimérico sintético, no formato de espuma. Esse polímero possui propriedades de absorvência, podendo conter bordas adesivas. O seu mecanismo de ação promove o controle do exsudato e do meio úmido na ferida provocando o desbridamento autolítico. Este material também é encontrado impregnado/depositado com íons de prata. Em geral, é indicado para feridas crônicas que possuam uma quantidade de exsudato entre média e alta (BOATENG 2008, SILVA et al., 2016). Porém é desaconselhado para feridas sem exsudação. É encontrado comercialmente nas marcas Hydrofilm[®], Curatec[®], Leukomed[®]T.

Os materiais poliméricos usados em curativos também se apresentam na forma híbrida, onde dois ou mais polímeros, sintético ou biopolimérico, são unidos em um único curativo, buscando combinar as propriedades dos materiais. Os curativos impregnados/depositados com ingredientes farmacêuticos ativos (APIs, do inglês *Active Pharmaceutical Ingredients*) têm se destacado entre os tratamentos para feridas da pele, apresentando vantagens como menor necessidade de manutenção do curativo, além da possibilidade de liberação de APIs, que potencializam e aceleram o tempo de regeneração do tecido. Esse tipo de tecnologia tem recebido destaque entre os novos tipos de curativos. Assim, cada vez mais os curativos com atividade terapêutica vêm sendo estudados, com foco em propriedades específicas, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade.

2.3. Curativos poliméricos impregnado/depositados com APIs, sintéticos ou substâncias bioativas de produtos naturais

A tecnologia de liberação dos ingredientes farmacêuticos ativos (API) pela via transdérmica pode apresentar vantagens sobre o sistema convencional de entrega oral. Esses curativos impregnados/depositados não fornecem uma taxa elevada de APIs, para serem metabolizados em órgãos internos. Assim, os tratamentos transdérmicos por curativos impregnado/depositados com APIs podem causar efeitos colaterais menos invasivos ao organismo humano, fornecendo uma melhor interface, buscando assim oferecer um grau menor de dor ao paciente, podendo aumentar a adesão e preferência por esse tipo de tratamento (BRAGA *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2013, SILVA *et al.*, 2016; WAGNER *et al.*, 2001, WU *et al.*, 2016). Além disso, alguns tipos de curativos atuam como depósitos de APIs, devido às suas estruturas porosas tridimensionais de preenchimentos (3D), que podem favorecer a função de

veículo transportador de APIs, aumentando a possibilidade de formar sistemas de entrega de APIs para locais específicos (ANDERS *et al.*, 2009; KLANGJORHOR *et al.*, 2012).

Os APIs denominados como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antissépticos, suplementos e outros, quando incorporadas em curativos poliméricos, desempenham um papel funcional no processo de cicatrização de feridas (ALTIOK *et al.*, 2010; BOATENG *et al.*, 2008), dependendo da homogeneidade e do perfil de liberação do API. A homogeneidade das doses da liberação de APIs é afetada pelas condições de processo de impregnação/deposição e por fatores como a estrutura da cadeia polimérica do curativo, a composição e a afinidade química entre o curativo e o API (BOATENG & CARTANZANO, 2015; BRAGA *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2013). A estrutura e a composição química dos curativos poliméricos, sintéticos ou naturais, influenciam propriedades como o controle das taxas de gases (vapor de água e oxigênio), a biocompatibilidade, a capacidade de inchamento e a cinética de liberação dos APIs. Esses fatores afetam a liberação dos APIs, que envolve diferentes processos físico-químicos como, hidratação do polímero, inchamento e mudança de textura, difusão do APIs através do curativo polimérico e erosão do curativo. A textura porosa da base polimérica é outra propriedade importante para o desenvolvimento da tecnologia de impregnação/deposição. Os curativos de textura porosa, tipo espuma, possuem uma alta área de superfície, o que favorece a adsorção e difusão do fluido de impregnação/deposição ($scCO_2$ + API) através da matriz polimérica (BOATENG *et al.*, 2015; CHAMPEAU *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de bactérias multirresistentes com a antibioticoterapia, tem feito que a Organização Mundial de Saúde promova e oriente P&D de novos antibióticos, o que tem destacado o uso de plantas medicinais. Isso tem acontecido para a tecnologia de curativos impregnado/depositados com APIs, que tem desenvolvido diversos trabalhos usando compostos bioativos de produtos naturais (BOATENG *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2018). Associado a esse fator está a biodegradabilidade do polímero do curativo que favorece a liberação do API. Esses fatores têm estimulado a combinação de biopolímeros e compostos bioativos. Em 2009, o Ministério da Saúde do Brasil divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS). A relação é de espécies de plantas medicinais, que podem ser aplicadas no serviço de saúde pública, pois possuem estudos químicos e farmacológicos, com potencial para o desenvolvimento de inovações tecnológicas na área de medicamentos fitoterápicos brasileiros (BRASIL, 2009; MARMITTI *et al.*, 2015).

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

Nesse contexto, pesquisas científicas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver biopolímeros impregnados/depositados com substâncias bioativas fitoterápicas, para aplicar como curativo avançado em cicatrização de feridas. São encontrados na literatura científica exemplos de curativos de matrizes tipo filmes sendo a base de quitosana impregnada com óleo de tomilho (ALTIOK *et al.*, 2010), ou a base de alginato impregnado/depositado com copaíba (PIRES; AOUADA, 2016), e curativos de matrizes tipo espumas 3D: bases de ácido hialurônico, quitosana e colágeno/celulose impregnadas com extrato de jucá (*Libidibia ferrea*) (DIAS *et al.*, 2013), base de ácido hialurônico impregnada com óleo de borage (sementes de *Borago officinalis*) (SILVA *et al.*, 2016), e base de colágeno impregnada com o *Macrotyloma uniflorum*, que tem atividade antibacteriana e atuou na preservação do curativo, aumentando a sua estabilidade contra a ação das collagenases (MUTHUKUMAR *et al.*, 2014). Os tratamentos com filmes biopoliméricos impregnado/depositados são limitados para tratamento de cicatrização de feridas pouco exsudativas devido à sua textura (MOURA *et al.*, 2013).

No mercado são encontrados diferentes curativos biopoliméricos impregnados/depositados com APIs, tanto sintéticos como bioativos de diferentes ações terapêuticas. Entre os exemplos pode-se citar o curativo Spongostan[®] incorporado com trombina um bioativo com ação coagulante, o Biatain[®]IBu incorporado com API sintético com ação analgésica, o Meliplex[®]Ag contendo API sintético de prata com ação cicatrizante, o Allevyn[®] incorporado com API sintético com ação cicatrizante, o Silverlon[®] incorporado com API sintético com ação cicatrizante, entre outros (BOATENG *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). Existe também, o adesivo Salonpas[®] que é um emplasto impregnado/depositado com bioativo salicitalo de metila, indicado para o tratamento tópicos com ação analgésica e anti-inflamatória.

Os curativos biopoliméricos (dispositivo médico) contendo APIs são considerados um produto de combinação (“*combination product*”) pela FDA que, em conjunto com a *European Medicines Agency* (EMA), o *Ministry of Health, Labour and Welfare* (MHLW) e a *Internacional Conference on Harmonization* (ICH) regulam os aspectos técnicos e normativos dos produtos de combinação. Outros exemplos desses produtos são dispositivos médicos capazes de entregar APIs em taxas controladas em local específico, implantes ortopédicos contendo fator de crescimento e cateteres contendo APIs antimicrobianos (BRAGA *et al.*, 2015).

Os sistemas biopoliméricos, capazes de entregar e liberar APIs em taxas terapêuticas homogêneas em períodos controlados (curto e/ou longo), mostram-se bastante promissores,

para os tratamentos clínicos hospitalares (BONAM *et al.*, 2015; BRAGA *et al.*, 2015; LANGER, *et al.*, 2013; SCHIERHOLZ *et al.*, 1997; UHRICH *et al.*, 1999). Assim, a impregnação/deposição de APIs em matrizes biopoliméricas tornou-se um procedimento habitual, para o tratamento de regeneração/reconstituição de tecidos, de cicatrização de feridas crônicas e agudas, de infecções e inflamações da pele, de perda de órgãos ou partes do corpo, ainda contra doenças oftalmológicas, entre outros (BRAGA *et al.*, 2008; GOYAL *et al.*, 2015; SCHIERHOLZ *et al.*, 1997; WU *et al.*, 2016).

2.4. Processos de impregnação/deposição de substâncias ativas em curativos biopoliméricos

A literatura relata diferentes métodos de impregnação/deposição de substâncias ativas derivadas de plantas ou bioativos em matrizes biopoliméricas. As viabilidades técnicas dos métodos de impregnação/deposição dependem das afinidades entre biomaterial e o bioativo e das condições de processamento. O sucesso do processo deve ser avaliado pela eficácia nos testes clínicos randomizados e sua efetividade no produto gerado, buscando realizar processos efetivos e eficientes (BONAM *et al.*, 2015, MARAGON *et al.*, 2017; PIRES *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016).

Os métodos de impregnação/deposição do bioativo na matriz biopolimérica são governados pelos princípios da transferência de massa e, dependendo do método, da termodinâmica. A complexidade desses processos envolvendo bioativos é maior, devido à composição química heterogênea e a presença de moléculas, às vezes termolábeis, derivadas de plantas. Assim, as condições do processo devem preservar as características químicas, biológicas dos bioativos, além de proporcionar uma padronização fitoquímica mínima, que atenda às legislações normativas de produção do produto (BRAGA *et al.*, 2015; CHAMPEAU *et al.*, 2015). Outra relação importante é entre a matriz, destacando as biopoliméricas, e as condições de processamento. O processo de impregnação/deposição adequado deve preservar ou formar a matriz biopolimérica. Um grande desafio tem sido o processo de impregnação/deposição das substâncias bioativas hidrofóbicas, em curativos tridimensionais (3D) biopoliméricos que, em geral, tem composição proteica de colágenos ou gelatinas (DIAS *et al.*, 2013; SILVA *et al.* 2018). As matrizes biopoliméricas de base proteica têm limitações de uso com solventes orgânicos, pois estes podem desnaturar as ligações peptídicas do

biopolimérico e deformar a estrutura (ANDERS *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2016). Além disso, as condições do processamento de impregnação/deposição não devem danificar as propriedades de textura (propriedades mecânicas, geométricas e de superfície) das matrizes manufaturadas ou das matrizes pré-moldadas (SILVA *et al.*, 2016).

2.4.1 Métodos de impregnação/deposição de substâncias bioativas a baixa pressão em materiais biopoliméricos

Na área médica, a incorporação de compostos bioativos em materiais sólidos ou semi-sólidos tem sido comum para a obtenção de materiais com propriedades específicas, que buscam atender diferentes necessidades. Assim, os métodos clássicos de impregnação/deposição de bioativos podem ser por (i) misturas físicas/“*blending*” (mistura de líquidos ou de sólidos, seguido por fusão; mistura física no estado sólido/semi-sólido; vazamento/evaporação de solvente); (ii) deposição superficial usando solvente ou calor; (iii) absorção/deposição de soluções líquidas/gasosas (imersão), (iv) reações químicas (polimerização, reticulação, sol-gel ou enxerto).

A incorporação/dispersão de substâncias bioativas em matrizes sólidas/semi-sólidas, bem como a preparação de formas sólidas/semi-sólidas de dosagem da indústria farmacêutica (cápsulas/saquetas, drágeas, grânulos e pó), envolvem processos farmacêuticos clássicos, baseados na mistura física (seca ou úmida) e na dispersão heterogênea dos APIs e dos excipientes, em baixas temperaturas, que podem ser seguidos dos processos de granulação, compressão (moldagem) e enchimento de cápsulas (Figura 1) (BRAGA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). Apesar da facilidade desses processos, estes apresentam uma grande desvantagem, que é a dispersão molecular heterogênea das substâncias bioativas na matriz polimérica. Isso pode ocasionar irregularidade na liberação dos compostos bioativos e flutuações nas taxas terapêuticas (SILVA *et al.*, 2018).

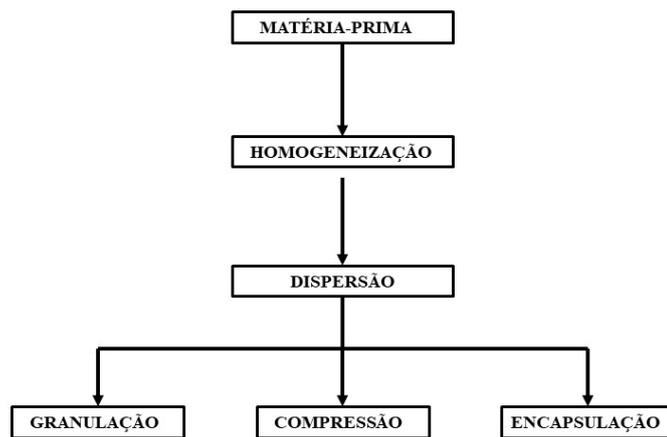


Figura 1. Processos farmacêuticos clássicos, baseados na mistura física.

O método impregnação/deposição de substâncias bioativas a baixa pressão em materiais biopoliméricos no processo industrial clássico, é realizado por mistura física seguido por fusão dos materiais. O processo consiste basicamente nas etapas iniciais de pesagem e homogeneização, em seguida a mistura é aquecida, em uma faixa de temperatura média de 100 a 150 °C. Logo após, são adicionados os bioativos. Na sequência, ocorre a extrusão ou moldagem da matriz polimérica, que pode ser realizada por técnicas de sopro ou injeção, seguidas por um resfriamento rápido, provocando a incorporação dos bioativos na matriz em várias formas tridimensionais (Figura 2). Uma desvantagem desse processo é a variação térmica, que pode provocar reações químicas indesejadas dos compostos bioativos, que em geral são termolábeis (BRAGA et al., 2015).

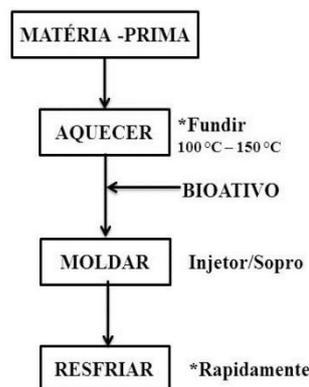


Figura 2. Processo de impregnação/deposição de bioativos por fusão em biopolímeros

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

O método de impregnação/deposição usando líquidos voláteis pode ser por dissolução/dispersão ou imersão da matriz biopolimérica na solução incorporadora. Geralmente esses métodos usam solventes orgânicos. O processo consiste na pesagem da matéria prima, em seguida são adicionadas as substâncias bioativas a serem homogeneizadas, com objetivo de formar a solução incorporadora. Em seguida, a solução incorporadora é dispersa sobre a base biopolimérica de impregnação/deposição. Finalizando o método, a etapa de secagem do solvente líquido, que pode ser feita por diferentes mecanismos, como liofilização, evaporação ou *spray-dring* (Figura 3). Embora muitas vezes não se utilizem altas temperaturas com esses métodos, sempre será necessário o uso de processos térmicos ou sob vácuo, para remoção do solvente orgânico em níveis aceitáveis. Isso pode aumentar o tempo e custo do processo, diminuindo sua eficiência (SILVA et al., 2016).

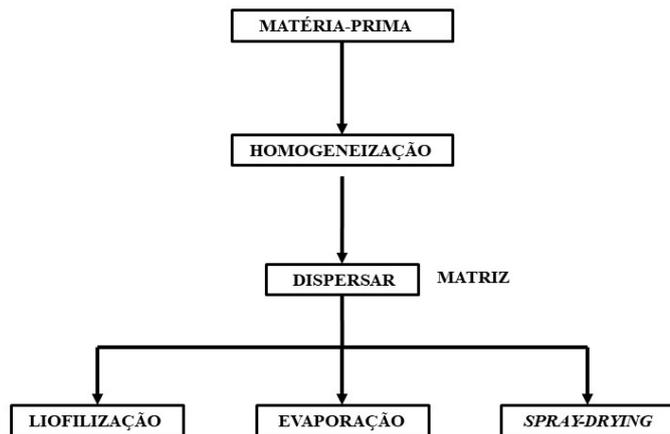


Figura 3. Processos de impregnação/deposição de bioativos em matrizes biopoliméricas usando líquido volátil.

O processo de impregnação/deposição por imersão em líquido é utilizado para estruturas porosas em geral. Esse método também se inicia com o preparo da solução incorporadora (bioativos + solvente orgânico), logo após a etapa de imersão, que pode ser em óleo *in natura* ou solução incorporadora. Em seguida, ocorre a etapa de imersão da matriz biopolimérica, que é impregnada na solução incorporadora. Este método pode apresentar desvantagens comuns como: possibilidade de baixa capacidade de inchamento do solvente na matriz, baixo coeficiente de partição do bioativo solubilizado e o incorporado sobre a matriz biopolimérica, baixa homogeneidade dos bioativos impregnados/depositados na matriz polimérica e longo tempo de processo, deformação da matriz biopolimérica e solvente residual necessitando da

etapa de secagem (ALTIOK *et al.*, 2010; BONAN *et al.*, 2015; BRAGA *et al.*, 2015). Mustapa *et al.* (2016) impregnaram/depositaram por imersão extratos vegetais de *Clinacanthus nutans* (*C.nutans*), ricos em bioativos de polifenóis e fitol, em aerogéis de alginato e sílica. Posteriormente, o solvente foi removido por secagem supercrítica de CO₂, levando à precipitação dos compostos na superfície e nos poros dos aerogéis devido à sua insolubilidade em CO₂. O aerogel de alginato exibiu maior massa impregnada/depositada de compostos bioativos, do que o aerogel de sílica, independentemente de suas propriedades de área de superfície. Neste caso, observou-se que, para o aerogel, a quantidade de massa impregnada/depositada dos compostos bioativos foi mais influenciada pelas outras propriedades das matrizes e a natureza dos compostos bioativos, do que pelas propriedades de superfície das matrizes.

A impregnação/deposição dos compostos bioativos pode ocorrer durante as reações químicas, que podem ser de polimerização, enxerto, ou sol-gel, com a possibilidade de produção de diferentes produtos (Figura 4). As matrizes biopoliméricas vão se formando durante as reações químicas e os compostos bioativos ficam retidos fisicamente no seu interior. Uma limitação desse método é o uso de solventes orgânicos ou compostos tóxicos, podendo gerar resíduos no produto final e contato prolongado. Além disso, são empregadas temperaturas no processo que podem atingir valores superiores a 80 °C, esses fatores podem provocar reações indesejadas de oxidação/degradação dos compostos bioativos e das matrizes biopoliméricas termolábeis (BRAGA *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2013).

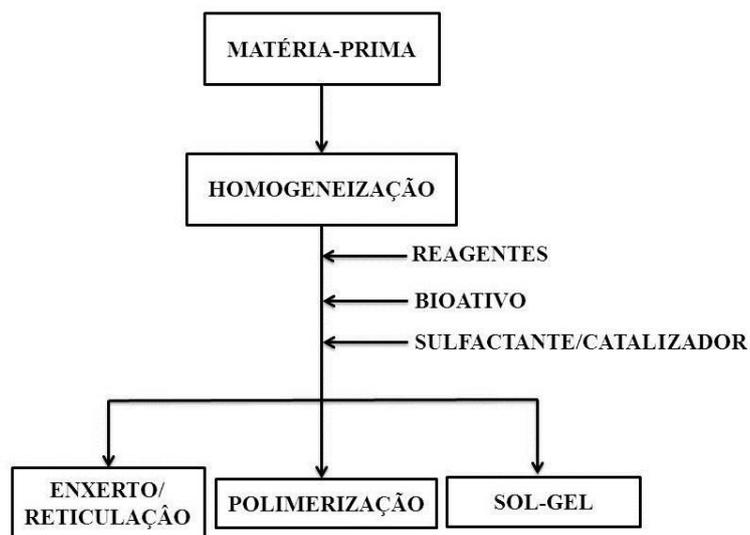


Figura 4. Processos de impregnação/deposição de compostos bioativos em base biopolimérica via reações.

2.4.2 Substâncias bioativas da copaíba (*Copaifera sp.*) impregnadas/depositadas em matrizes poliméricas

As substâncias bioativas, derivadas de plantas, incorporadas nas matrizes poliméricas são também aplicadas em tratamentos de várias desordens da saúde humana. Entre as plantas medicinais brasileiras, destaca-se a copaíba (*Copaifera sp.*), nomeadamente a sua oleorresina, que possui atividades terapêuticas de uso na medicina popular brasileira, com ação cicatrizante de feridas e gastroprotetora. Além disso, o óleo é usado contra inflamações, infecções, trombose e dores musculares. A seleção etnofarmacológica da oleorresina de copaíba para uso medicinal foi realizada de acordo com o uso terapêutico, evidenciado inicialmente por povos indígenas. Os bioativos das diferentes espécies de *Copaifera ssp.* têm como principais atividades terapêuticas: antibacteriana (BONAN *et al.*, 2015; MORELLI, *et al.*, 2015), anti-inflamatória (LUCCA *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2015; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007), antitumoral (BATISTA *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2003;), cicatrização de feridas (ESTEVÃO *et al.*, 2013; PAIVA *et al.*, 2002), ação imunológica (SANTIAGO *et al.*, 2015), anti-leishmania nas fases amastigota e promastigota da doença (SANTOS *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2013), analgésica, anti-helmíntica, tripanocida, relaxante muscular (CARVALHO *et al.*, 2004, WO2005110446 A1; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005), gastroprotetora (LEMOS *et al.*, 2015), e contra patogêneses orais (BARDAJÍ *et al.*, 2016).

A fração volátil da oleorresina de copaíba é a parte de maior valor agregado de mercado, constituída majoritariamente de substâncias bioativas pertencentes à classe dos terpenos, predominando os sesquiterpenos. Os sesquiterpenos (β -cariofileno, o β -bisaboleno, o α -bergamoteno, o β -selineno, o α -copaene, o α -cis-bergamotene, o α -humuleno, o γ -muurolene, o germacrene-B e o 9-epi-(E)-cariofileno) são os de maior interesse industrial para área medicofarmacêutica. Estes terpenos podem ser utilizados para determinar a composição química e apresentar padrões químicos das diferentes espécies de copaíba (BASTOS; SILVA, 2011, WO2011120118A1; BONAN *et al.*, 2015; CARVALHO, 2004, WO2005110446 (A1); LEMOS *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2004; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002, 2005). Os diterpenos tetracíclicos da série kaurano também são substâncias bioativas que podem estar presentes na composição da oleorresina de copaíba, como os ácidos caurenóico (FERRARI *et al.*, 1971), os clerodanos como o ácido hardwickiic (MACIEL *et al.*, 2002; MAISTRO, 2005), entre outros. Nas partes aéreas (folhas) da copaíba são encontradas substâncias bioativas da classe dos terpenos (mono e triterpenos) e flavonoides como a

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

quercetina-3-O-ramnosídeo e o canferol-3-O-ramnosídeo (VEIGA; PINTO 2006). As atividades farmacológicas mais estudadas das partes aéreas da *Copaífera ssp.* são: tratamento de litíase renal, artrites, tártaros, dores musculares e espasmódicas em geral, inflamações, antioxidante e infecções do trato urinário (BASTOS; SILVA, 2011, WO2011120118 A1; BATISTA *et al.*, 2016).

Vieira *et al.* (2008) prepararam uma emulsão por mistura física de oleorresina de copaíba *in natura* e óleo mineral (1:1), para estudar o reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho, onde foram realizadas avaliações macro e micro (histológicas) dos tecidos, realizando testes *in vivo* com 60 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (2 e 3 meses de idade). Nos testes observou-se que a oleorresina e a emulsão atuaram biologicamente favorecendo a síntese de matriz extracelular e proliferação fibroblástica auxiliando na cicatrização, porém interferiram de forma negativa na reepitelização do tecido dérmico, o que é um forte indicativo da limitação da emulsão para o tratamento de cicatrização de feridas na pele (VIERA *et al.*, 2008).

Morelli *et al.* (2015) incorporaram a oleorresina de copaíba em polímero sintético biodegradável de poliácido láctico (PLA), usando o método de mistura física seguida por fusão dos materiais e adição dos bioativos, com subsequente espalhamento em molde (diâmetro de 10 cm) de politrafluoroetileno (PTFE). Foi utilizando clorofórmio como solvente no método, onde a etapa de secagem foi realizada à temperatura ambiente, em sistema de evaporação controlada. O objetivo do trabalho foi a impregnação/deposição dos compostos bioativos da copaíba em filmes poliméricos biodegradáveis, visando sua aplicação para embalagens. O rendimento de óleo incorporado teve uma grande variação, quando mensurado por diferentes técnicas (gravimétricas e espectroscópica UV), relacionado à possível evaporação dos compostos bioativos da copaíba durante o processo, além da pequena exsudação do óleo de copaíba pelos filmes de PLA. Nesse método, é comum o uso de solventes orgânicos, como diclorometano, hexafluorisopropanol, etanol, ácido acético, clorofórmio, tolueno, benzeno e acetona para ambos, polímeros sintéticos e biopoliméricos (ALTIOK *et al.*, 2010; BASAK *et al.*, 2009; GOYA *et al.*, 2015; MORELLI *et al.*, 2015 YUDANOVA & RESHETOV, 2006).

A oleorresina da copaíba *in natura* foi impregnada em matriz biopolimérica de celulose pelo método de imersão, com tempo de imersão de 1 hora a 25 °C, sendo que a etapa de secagem durou 4 dias à temperatura ambiente (MORELLI *et al.*, 2015). Apesar das desvantagens do método, tais como baixa seletividade, período longo de secagem e heterogeneidade da

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

oleorresina impregnada no papel, o trabalho de Morelli *et al.*, (2015) apresentou resultados positivos para ação antimicrobiana da copaíba, mostrando uma inibição no halo de crescimento bacterino de de 22 cm, o dobro obtido pelo óleo puro (11cm). A impregnação/deposição de substâncias bioativas do oleorresina de copaíba em matrizes poliméricas pode ter protegido os bioativos dos fatores ambientais evitando a redução do seus efeitos terapêuticos (MUSTAPA *et al.*, 2016).

Maragon *et al.*, (2017) produziram um gel através de interações iônicas, onde os biopolímeros, quitosana (DA = 9,7% e MW = $1,5 \times 10^5$ g/mol) e gelatina (colágeno de pele porcina processado), foram impregnado/depositados com oleorresina de copaíba. O óleo foi solubilizado utilizando-se 1% de solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO), no qual os materiais foram homogeneizados e submetidos à agitação mecânica durante 30 minutos. A copaíba formou gotas na emulsão com diâmetros que variaram entre 0,0269 e 0,01442 mm. Esses valores podem ser importantes para definir a aplicação médica da emulsão, pois quanto menor o diâmetro da gota maior será a área de contato da gota com a superfície lesionada. A concentração média da emulsão foi de 125 µg de oleorresina por 1 mL de gel quitosana-gelatina (2:1, p/p). Foi estudada a concentração de inibição mínima dos matérias puros, óleo, quitosana, gelatina, e da emulsão. Nos ensaios *in vitro*, a emulsão teve ação antibacteriana em menor concentração e mais rápida, quando comparada à oleorresina pura e aos geis puros. O estudo sugere sinergismo entre os bioativos da copaíba e os biomateriais para atividade antimicrobina. O β-cariofileno foi o bioativo relacionado à atividade contra a *Staphylococcus aureus* (MARAGON *et al.*, 2017).

Para a introdução da oleorresina de copaíba no mercado é necessário que todos os seus compostos bioativos ofereçam segurança, biocompatibilidade e toxicidade comprovada (além de possíveis produtos de degradação), apresentando pureza, homogeneidade e estabilidade (BRAGA *et al.*, 2015). Na maioria dos processos de impregnação/deposição de bioativos da copaíba em polímeros estudados, utilizaram-se solventes orgânicos para diferentes funções, tais como reagente, agente dissolvente e agente extrator. Segundo o *Guidelines ICH Q3C* (EMA, 2016), esses solventes são classificados na classe 1 de compostos cancerígenos, e na classe 2 de compostos de alto grau de toxicidade. Porém, não são cancerígenos até limites estabelecidos, conforme mostra a Figura 29 (GRODOWSKA; PARCZEWSKI, 2010). Além disso, o solvente deve ter um coeficiente de partição favorável no processo, ou seja, permitir a transferência de massa das substâncias bioativas solubilizadas para a matriz biopolimérica. As diferentes afinidades entre os solventes orgânicos e os bioativos naturais do processo exigem testes

analíticos para determinar a solubilidade e as fases em equilíbrio do sistema de impregnação/deposição em diferentes condições de processo (concentrações do bioativo natural, pressão e temperatura) (MORELLI *et al.*, 2015; MARAGON *et al.*, 2017; XAVIER-JUNIOR *et al.*, 2017).

Os processamentos em escala industrial, de impregnação/deposição de bioativos da copaíba em biopolímeros, se limitam ao uso de solventes orgânicos, que apresentam riscos físicos e químicos na manipulação, sendo necessário o uso de temperaturas elevadas para a sua remoção. Assim, os resíduos no produto final aumentam o risco da manipulação no processo e consequentemente o custo final do produto (GRODOWSKA; PARCZEWSKI, 2010). Apesar, dos trabalhos científicos realizados com métodos de impregnação/deposição de bioativos em matrizes biopoliméricas, ainda persistem muitas dificuldades e desafios para obtenção de processos eficientes, de menores custos e rápidos. A distribuição homogênea das substâncias bioativas no produto, a remoção dos solventes, os riscos químicos e físicos são os principais obstáculos à eficiência dos processos que usaram solvente orgânicos (PIRES *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016).

2.4.3 Métodos de impregnação/deposição de substâncias bioativos em matrizes biopoliméricas usando dióxido de carbono supercrítico

As empresas farmacêuticas têm buscado o desenvolvimento de processos sustentáveis e o aperfeiçoamento industrial, em atendimento às necessidades tanto ambientais quanto econômicas. Assim, os processos que usam solventes supercríticos vêm ganhando destaque. Os principais processos são a extração, o fracionamento, a purificação, a micronização e a impregnação/deposição de bioativos, pois, quando comparados aos métodos convencionais que usam solventes orgânicos, podem apresentar vantagens: menor tempo de processamento, menor custo operacional, menor geração de resíduos, melhor distribuição homogênea dos bioativos, além de menor degradação térmica e menor oxidação, tanto do produto natural como da matriz polimérica (REVERCHON; DE MARCO, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2008, VIEIRA DE MELO *et al.*, 2009).

Entre os métodos que usam solventes no estado supercrítico, para o desenvolvimento de produtos biomédicos, destaca-se o de impregnação/deposição de bioativos hidrofóbicos, usando solvente supercrítico (SSI/SSD, do inglês “*Supercritical Solvent Impregnation/ Supercritical Solvent Deposition*”). Esse método é previamente descrito na literatura, destacando os

processos que utilizam como solvente o dióxido de carbono no estado supercrítico (scCO₂). O método SSI/SSD foi inicialmente utilizado/indicado para o desenvolvimento de aplicações farmacêuticas há mais de 30 anos por Berens, Sand, Paulaitis, Perman e colaboradores (BRAGA *et al.*, 2015), onde é possível encontrar registros de patentes em bancos internacionais (BERENS *et al.*, 1989, US 4820752; SAND, 1986, US 4598006; SOUSA *et al.*, 2006, EP1611877, US20060008506).

Os processos de impregnação/deposição de princípios bioativos em matrizes biopoliméricas sólidas usando solvente supercrítico apontam para uma tecnologia promissora. Pesquisas mostraram que processos de impregnação/deposição de compostos bioativos, utilizando fluido supercrítico, podem ser mais eficientes que os métodos convencionais por imersão em solvente orgânico (KIKIC; VECCHIONE, 2003; BRAGA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2011, SILVA *et al.*, 2018), pois possuem vantagens quanto ao produto final, como maior interação entre o biopolímero e o bioativo, além de alta dispersão do bioativo na matriz polimérica, aumentando o contato entre o curativo e a ferida (DIAS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Entre os solventes supercríticos possíveis para esse tipo de processo, o scCO₂ tem sido o mais utilizado. As principais propriedades do solvente scCO₂ para sua ação dispersante nos sistemas a alta pressão são: a densidade próxima aos líquidos, que favorece solubilização do bioativo pelo solvente, a baixa viscosidade e alta difusividade molecular, cujos valores são típicos dos gases, que favorece difusão, permitindo que a solução (scCO₂ + bioativo) penetre nos poros da matriz biopolimérica sem danificar as estruturas, e ocorra a impregnação/deposição de bioativos no material. Além disso, a baixa tensão superficial e a possibilidade de fácil recuperação do solvente em sistemas fechados, para impregnação/deposição de novos bioativos em bases biopoliméricas, torna o dióxido de carbono o solvente mais utilizado em processamentos usando fluido supercrítico com aplicações biomédicas (BRAGA *et al.*, 2008; CABEZA *et al.*, 2016; KIKIC; VECCHIONE, 2003).

O CO₂ denso, ou seja, em condições de temperatura (T) e pressão (P) em que sua densidade se aproxima da densidade crítica ou supercrítica, é considerado um solvente “verde” em um sistema fechado capaz de recuperá-lo, pois tem características como: baixa toxicidade, não degrada nem a matriz polimérica nem o bioativo, tornando-se atraente para uso em processos industriais, além disso, nas questões ambientais reduz os problemas com a legislação

de emissão de solventes voláteis (BRAGA *et al.*, 2015). O scCO₂ pode desempenhar um efeito plastificante, causando mudanças temporárias nas propriedades mecânicas e térmicas do polímero, tendo uma ação “lubrificante”. Por possuir baixa massa molecular, pode aumentar a flexibilidade da cadeia dos polímeros, facilitando o processo de difusão da substância bioativa dentro da cadeia polimérica (DIAS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016, SANCHEZ *et al.*, 2017). Assim, o SSI/SSD vem despertando o interesse em pesquisas e desenvolvimento de novos produtos, e otimização de etapas do processo.

O método SSI/SSD é possível de ser aplicado quando o sistema biopolímero/scCO₂/bioativo atende às seguintes condições: os bioativos são solúveis no fluido supercrítico; ocorre o inchamento/aumento do polímero pelo solvente supercrítico; e o coeficiente de partição, do bioativo solúvel no biopolímero por bioativo solúvel no solvente supercrítico, é favorável para a matriz biopolimérica impregnada (KIKIC; VECCHIONE, 2003; BRAGA *et al.*, 2015, CHAMPEAU *et al.*, 2015). Os sistemas formados pelos biopolímeros e bioativos impregnado/depositados devem possuir propriedades reológicas, mecânicas e físico-químicas atrativas.

Um ensaio experimental típico do método SSI/SSD usando dióxido de carbono é realizado em diferentes equipamentos laboratoriais, que são ilustrados na Figura 5. O esquema mostra uma instalação experimental descontínua, onde a solubilização dos bioativos no scCO₂ ocorre no mesmo vaso de impregnação/deposição. Em geral, tem sido o método mais adotado para a impregnação/deposição de bioativos (AMERI *et al.*, 2020; CHAMPEAU *et al.*, 2015). No esquema do equipamento utilizado para SSI/SSD, podem-se observar quatro etapas importantes do processo, que são descritas a seguir, onde os fenômenos característicos do método de impregnação/deposição, de adsorção e absorção do solvente no biopolímero ocorre na célula de impregnação/deposição (5).

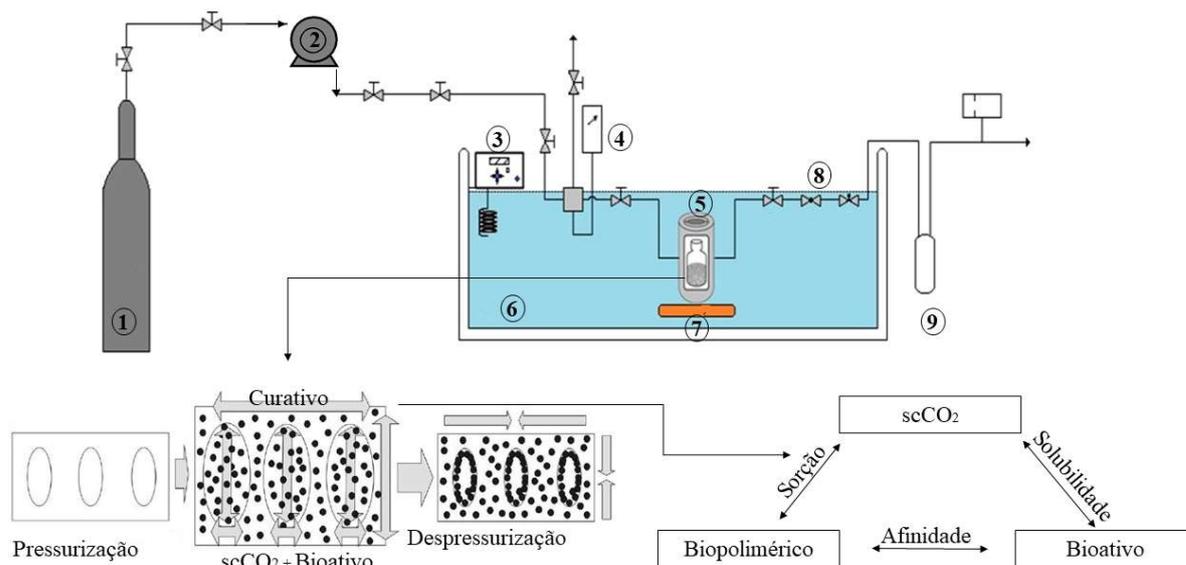


Figura 5. Na parte superior tem a ilustração da instalação experimental de processo descontínuo do SSI/SSD usando dióxido de carbono, representado pelo cilindro de CO₂ (1), bomba (2), termostato digital (3), manômetro digital (4), célula de impregnação/deposição (5), banho termostático (6), agitador magnético (7), válvulas (8) e trap (9), enquanto que na parte inferior mostra a impregnação/deposição do bioativo nos poros da matriz polimérica e as principais interações que influenciam o sistema biopolímero/scCO₂/bioativo. Fonte: Adaptado de BRAGA et al., 2015; KIKIC; VECCHIONE, 2003; ROSA, 2013)

A primeira etapa é a pressurização do solvente (dióxido de carbono). Nessa etapa, o CO₂ está armazenado no cilindro (1), em condições em que há o equilíbrio líquido-vapor (geralmente pressão de 60 a 70 bar e temperatura de 20 a 25 °C). As aberturas controladas das válvulas de alta pressão liberam o fluido levando-o a bomba (2). A bomba é acondicionada em uma manta térmica de refrigeração, mantendo a temperatura do CO₂ abaixo de -15 °C, garantindo a fase líquida do solvente, evitando cavitação na bomba. Logo após, o solvente sofre compressão (na faixa de 75 a 400 bar) sendo bombeado para a célula de impregnação/deposição (5). Dentro da célula estão localizadas as matrizes biopoliméricas na posição vertical (de modo a diminuir a deposição do material na etapa de despressurização) e o bioativo, formando o sistema biopolímero/scCO₂/bioativo. Durante a estabilização do SSI/SSD, o solvente atinge a condição supercrítica, favorecendo a solubilização do bioativo presente na parte inferior da célula e a impregnação/deposição na matriz polimérica suspensa no interior da célula (BRAGA *et al.*, 2015; CHAMPEAU *et al.*, 2015 SILVA *et al.*, 2016).

As segunda e terceira etapas ocorrem na célula de impregnação/deposição (5), que tem as temperaturas ajustadas por um sistema de aquecimento (3), e pressão monitorada por um

transdutor de alta pressão digital (4), em um banho termostático usando água ou ar (6), além de um agitador magnético (7). Na segunda etapa ocorre o fenômeno de dissolução da substância bioativa (solubilidade) no solvente supercrítico e é afetada pelas propriedades de pressão de vapor do soluto (bioativo) e a densidade do scCO_2 . Ambas as propriedades podem ser variadas pelo ajuste de temperatura e pressão do processo, fatores decisivos também para seletividade do SSI/SSD (BRAGA *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2015; CHAMEPAU *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2011).

A terceira etapa é o processo estático de SSI/SSD, que promove o contato entre as matrizes poliméricas sólidas e as misturas de fluidos (solvente + bioativo). Nessa fase, ocorre o fenômeno de sorção do scCO_2 pela matriz, provocando o intumescimento na cadeia biopolimérica. Esse acréscimo de volume é devido primeiramente a adsorção de scCO_2 na superfície da matriz polimérica. Essas moléculas de scCO_2 são absorvidas pelo seio da matriz polimérica, penetrando e difundindo-se pela matriz, causando o inchamento do biopolímero. Essa difusão do scCO_2 pela matriz reduz as interações intermoleculares nas cadeias poliméricas, o que faz aumentar o diâmetro dos poros e conseqüentemente o volume da matriz biopolimérica (YU *et al.*, 2013), representada na Fig. 5 por um curativo. Esse é o comportamento típico e ideal para o biopolímero a ser processado no método SSI/SSD. Para isso, é necessário haver afinidade química entre o scCO_2 e o biopolímero, provocando a difusão do solvente supercrítico através da matriz, porém o solvente supercrítico não deve ser capaz de solubilizar a matriz biopolimérica. Essa ação do solvente facilita a penetração do fluido de impregnação/deposição composto pelo scCO_2 + bioativo. Assim, o bioativo é difundido para dentro da matriz porosa, onde ocorre a sua impregnação/deposição na estrutura biopolimérica. É de fundamental importância conhecer a afinidade química entre as substâncias bioativas e a matriz biopolimérica, e as condições termodinâmicas do método, para que ocorra uma transferência de massa significativa, fator de sucesso do processo de impregnação/deposição (DIAS *et al.*, 2013; KIKIC; VECCHIONE, 2003; SILVA *et al.*, 2016).

A última etapa é caracterizada pela despressurização do sistema através da abertura das válvulas de ajuste fino (8). Nessa etapa, o scCO_2 muda de fase, passando para $\text{CO}_{2(g)}$, com taxa de despressurização controlada, pois este parâmetro do processo afeta o rendimento da impregnação/deposição de bioativo na matriz biopolimérica. A solubilidade do composto bioativo em scCO_2 diminui com a redução da pressão no sistema, por exemplo com substâncias polares, caso seja rápida a despressurização, isso pode aumentar o número de moléculas depositadas na superfície biopolimérica, devido a baixa afinidade química entre o soluto e o

solvente. Porém, para impregnações/deposições realizadas com bioativos de baixa polaridade, a taxa de despressurização deve ser lenta, para evitar que os compostos bioativos sejam arrastados pelo scCO₂ diminuindo o rendimento de massa depositada no biopolímero. Além disso, a etapa de despressurização rápida pode deformar a matriz com altas taxas de desorção do solvente supercrítico e mudança abrupta para a fase gasosa (BASTANTE et al., 2017; SANCHEZ et al., 2017). O dióxido de carbono, após sair da célula de impregnação/deposição, passa por um *trap* de vidro (9) e um filtro, sendo liberado o CO_{2(g)}. No final do processo, o produto é um biopolímero seco e impregnado/depositado com compostos bioativos de produtos naturais (COSTA et al., 2010). A taxa de despressurização depende da afinidade do scCO₂ com o composto bioativo, e da textura da matriz biopolimérica (DIAS et al., 2013). Assim, é promissor o uso de CO₂ pressurizado, como solvente no SSI/SSD nos processos de impregnação/deposição de compostos bioativos de baixa polaridade (hidrofóbicos) em matrizes biopoliméricas (PAINTER; COLLEMAN, 2009; SILVA et al., 2018).

No método SSI/SSD ocorrem dois mecanismos simultâneos, um responsável pela impregnação e outro pela deposição dos bioativos na matriz biopolimérica. No mecanismo de impregnação ocorrem interações físico-químicas entre o bioativo e o biopolímero, onde o fluido incorporador (scCO + bioativo) dispersa-se pela cadeia biopolimérica, diminuindo as forças intermoleculares da matriz, flexibilizando-a e aumentando o seu volume livre, permitindo assim a penetração de uma quantidade maior de fluido incorporador. Esses fatores provocam o intumescimento da matriz biopolimérica aumentando o seu volume. A impregnação é influenciada pela afinidade do bioativo-biopolímero na dispersão sobre a matriz e no coeficiente de partição, e pela interação scCO₂-biopolímero, que são reponsáveis pela dilatação e efeito plastificante na matriz, causados pelo dióxido de carbono supercrítico. O mecanismo da deposição física do bioativo no biopolímero está associado à passagem dos fluidos a altas pressões na matriz, que pode causar deformações mecânicas e rupturas dos poros com formação de novos poros. Após a despressurização do sistema, o scCO₂ muda para CO_{2(g)}, o que faz as solubilidades dos compostos bioativos diminuírem no solvente, depositando-se por precipitação/sedimentação na superfície da biopolímero. Outras propriedades da matriz podem afetar o fenômeno de deposição, como a natureza química da matriz e suas propriedades de textura (MUSTAPA et al., 2016; CHAMPEAU et al., 2015).

A Figura 5 mostra um diagrama do scCO₂/Biopolímero/Bioativo, com as principais interações geradas no sistema de impregnação/deposição, que envolvem os fenômenos de solubilidade scCO₂-bioativos, de sorção scCO₂-biopolímero e de afinidade biopolímero-

bioativos. No SSI/SSD é importante o processo de solubilização dos compostos bioativos pelo scCO₂ (KIKIC; VECCIRONE, 2003; AMERI et al., 2020). A solubilidade é uma propriedade que depende da proximidade das moléculas do scCO₂ e dos compostos bioativos. No SSI/SSD, a solubilidade é dada pela quantidade de substâncias bioativas (soluto) que se dissolve em uma quantidade determinada de scCO₂ (solvente), a uma dada temperatura e pressão, podendo ser expressa através da fração molar ou fração mássica, do soluto na solução (BARTLE *et al.*, 1991; MARTINS et al., 2013). O soluto (em menor quantidade) é a parte do sistema que se deseja solubilizar, enquanto que o solvente (em maior quantidade) é a substância que dissolve o soluto. As forças intermoleculares que regem a interação soluto e solvente devem ser capazes de vencer as próprias forças intermoleculares das moléculas do soluto e solvente, para que ocorra a interação e o processo de solubilização. Sendo assim, solvente de baixa polaridade tem afinidade por substâncias hidrofóbicas, enquanto que solvente de alta polaridade tem afinidade por substâncias hidrofílicas (MARTINS et al., 2013). A solubilidade do soluto no scCO₂ depende dos seus grupos químicos, polaridade e peso molecular. O scCO₂ possui caráter apolar, possuindo afinidade para compostos hidrofóbicos (BRAGA et al., 2015). Além disso, quanto mais denso o solvente for por causa da pressão, maior será o número de interações e a capacidade de solubilização do soluto. A solubilidade no processo SSI/SSD pode ser controlada por condições operacionais do processo de pressão e temperatura do sistema (AMERI et al., 2020; BOTELHO et al., 2015; CABEZA *et al.*, 2016). Caso o soluto e solvente tenham alta afinidade, a taxa de depressurização do SSI/SSD deve ser baixa, para evitar a perda do composto bioativo nessa etapa e conseqüentemente a diminuição do rendimento das moléculas impregnadas/depositadas. Assim, é eficiente operar com o sistema supersaturado no SSI/SSD, ou seja, acima da concentração de solubilidade máxima do bioativo no scCO₂, porque garante que a fração solúvel se difunda pela matriz biopolimérica, e como sempre vai algo por arrasto na depressurização, acaba por se depositar no polímero para além de impregnado, aumentando o rendimento do processo (AREDO et al., 2019).

Michielin *et al.* (2009) estudaram a solubilidade em scCO₂ do α -humuleno e o trans-cariofileno nas temperaturas de 30, 40 e 70 °C e pressão de 20 MPa, enquanto Maschietti (2011) investigaram a solubilidade do cariofileno nas temperaturas de 50 e 70°C, mostrando que o aumento da pressão aumentava a solubilidade dos bioativos no scCO₂. Apesar dos diversos métodos para predição da solubilidade, ainda existem grandes dificuldades e desafios de se obterem cálculos prévios e precisos da solubilidade de sólidos e líquidos em solventes supercríticos para compostos naturais. Isso provavelmente está relacionado à complexidade da

composição da mistura de substâncias bioativa com diferentes pressões de vapor (PEREIRA, 2015).

A sorção máxima de $scCO_2$ pelas matrizes biopoliméricas é outro fator importante do SSI/SSD, sendo composto pelos fenômenos de absorção e adsorção. Os mecanismos de sorção de CO_2 pelas matrizes poliméricas, mais comuns para sistemas de alta pressão, podem acontecer de duas formas. No primeiro mecanismo, as principais interações ocorrem entre as cadeias poliméricas, assim, a concentração do fluido penetrante irá obedecer uma relação linear, entre o coeficiente de solubilidade e a pressão, descrevendo uma difusão aleatória do fluido supercrítico sobre a matriz polimérica. O segundo mecanismo de sorção, sofre influência das forças de interação entre o fluido supercrítico e o polímero, assim, a concentração do fluido penetrante é relacionada à constante de saturação do orifício da matriz polimérica, a constante de afinidade, evidenciando a relação entre a matriz polimérica e o fluido supercrítico (JESPERSEN, 2002).

Pesquisas foram realizadas com matrizes poliméricas, durante o equilíbrio termodinâmico em sistemas de alta pressão. O objetivo foi calcular a sorção de CO_2 pelo polímero e observar o mecanismo e as influências das condições de processo (pressão, temperatura e tempo). Com isso, buscam-se otimizar os tempos de pressurização e depressurização do processo (JESPERSEN, 2002; DIAS et al., 2013). Isso é importante para o processamento de produtos naturais, pois longos períodos de processo, que incluem modificações na cadeia biopolimérica e subsequente adição de bioativo, têm apresentado resultados ineficientes (YUDANOVA; RESHETOV, 2006). Silva *et al.* (2018), trabalhando com um biomaterial em forma de placa porosa, à base de colágeno e celulose regenerada, teve maior sorção de $scCO_2$ a 35 °C, no tempo de uma hora de processo, o que pode gerar um produto heterogêneo. Por vezes essa heterogeneidade pode ser desejada, dependendo da aplicação final do produto.

No SSI/SSD ocorre o fenômeno de interação do biopolímero e os compostos bioativos, que depende da natureza e afinidade química dos materiais, influenciando o SSI/SSD no rendimento de compostos bioativos impregnados/depositados e o perfil de liberação destes bioativos. Champeau et al., (2020), impregnou/depositou cetoprofeno em suturas de PLA por SSI/SSD, aonde amostras de suturas brutas, submetidas apenas a $scCO_2$ e as impregnadas/depositadas com cetoprofeno foram imersas em tampão de fosfato-salino a 37 °C por 5 semanas, observando uma redução na massa de PLA de 30 % a mais nas suturas

impregnadas/depositadas com o fármaco em comparação as outras duas, não havendo diferença entre estas. Nesse estudo, a afinidade química do polímero e o fármaco mostrou que quanto maior a carga impregnada/depositada de fármaco, maior foi a taxa de degradação do polímero, isso porque o cetoprofeno tem uma função de ácido carboxílico em sua molécula, que pode catalisar a hidrólise das ligações de ésteres do PLA, acelerando sua degradação (CHAMPEAU et al., 2020). A difusão da fase fluida (scCO₂ + bioativo solubilizado) através da fase biopolimérica envolve o fenômeno de transferência de massa, sendo afetada diretamente pelas propriedades de miscibilidade (afinidade química, polaridade, pressão de vapor, densidades, entre o bioativo e o solvente supercrítico) (CABEZA et al., 2016), esse fenômeno ocorre espontaneamente até o equilíbrio termodinâmico, ou seja, a solubilização dos bioativos em scCO₂ e a sorção de scCO₂ pelo biopolímero (CHAMPEAU et al., 2020). O método SSI/SSD tem alta influência das propriedades termodinâmicas dos sistemas como pressão, temperatura, concentração inicial do soluto, taxa de despressurização, coeficiente de partição (solvente/bioativo/matriz), textura da matriz biopolimérica e o tempo de processo. Além do entendimento dos fenômenos de transferência de massa (sorção e difusão) em relação ao processamento dos bioativos, e das matrizes biopoliméricas (DIAS et al., 2013; BASTANTE et al., 2017; SANCHEZ et al., 2017; SILVA et al., 2016). Assim, o desenvolvimento do processo SSI/SSD depende tanto dos fenômenos e propriedades típicos da termodinâmica, destacando-se temperatura, pressão, densidade e solubilidade, como de transferência de massa, destacando-se o gradiente de concentração, o coeficiente de difusão e a textura da matriz incorporada.

Dias et al. (2013) impregnaram, através do uso do SSI/SSD, o extrato de Jucá (*Libidina férrea*) em curativos biopoliméricos do tipo espuma. Os biopolímeros foram os curativos comerciais Promogran[®] (colágeno) e Hyalofill[®] (ácido hialurônico), e espumas de N-carboxibutil quitosana (CBC) sintetizadas. Ambas espumas biopoliméricas tinham espessura aproximadamente de 0,3 mm. No estudo, as taxas de despressurização foram de 3 MPa/min e 10 MPa/min e não causaram diferença significativa na quantidade total de extratos carregados nos biopolímeros. A temperatura foi de 50 °C, devido à termossensibilidade dos materiais (curativo e bioativo natural). O CBC foi o biopolímero que teve o maior rendimento no SSI/SSD, de 0,46 a 0,48 mg de extrato/mg de biopolímero, em seguida foi a Promogran[®], na faixa de 0,28 a 0,31 mg de extrato/mg de biopolímero, e o Hyalofill[®]. O estudo aponta que o caráter hidrofóbico dos biomateriais aumentou o rendimento de extrato hidrofóbico impregnado/depositado por massa de biopolímero.

SILVA et al. (2018) usaram o SSI/SSD para impregnar o extrato de flores de jambu em matrizes biopoliméricas de colágeno e celulose, de curativos manufaturados Promogran[®], onde os ensaios foram realizados nas seguintes condições: modo estático com 4 horas de processo, na temperatura de 35 °C e taxa de despressurização de 0,5 MPa.min⁻¹. Além disso, realizaram-se ensaios prévios de sorção da base biopolimérica por scCO₂ para definir as melhores condições de processamento. O maior rendimento de impregnação/deposição do extrato foi 6,4 % (m/m), ocorrendo nas melhores condições de sorção, que foram na temperatura de 35 °C e densidade do scCO₂ igual a 850 kg.m⁻³. O etanol foi utilizado como co-solvente (95:5 % molar), aumentando em 2,5 vezes o rendimento da massa impregnada/depositada no biopolímero.

Arede et al. (2019) utilizaram o método SSI/SSD para impregnar bioativos de licopeno em partículas de colágeno hidrolisado. Os ensaios foram realizados nas pressões de 15 e 25 MPa, nas temperaturas de 50 e 60 °C, taxa de despressurização de 1 MPa/min, com tempo de impregnação/deposição de 45 minutos, em batelada. Os maiores rendimentos de eficiência de impregnação/deposição aconteceram a 15 MPa e 50 °C. O estudo atribui esse rendimento ao aumento de solubilidade do bioativo no scCO₂ nas condições de 25 MPa e 60 °C, podendo favorecer a perda do bioativo na etapa de despressurização, que é importante para o aprimoramento da técnica.

Mustapa et al. (2016) impregnaram fitol e extratos vegetais da *Clinacanthus nutans* em aerogéis de alginato por SSI/SSD. A impregnação/deposição dos bioativos em aerogéis de alginato produziu altos teores de fenóis totais e flavonoides. O biopolímero de alginato plastificado foi formado quando a impregnação/deposição supercrítica foi realizada com excesso de fitol a 200 bar e 40 °C, indicando que o efeito de intumescimento e/ou plastificação do scCO₂ pelo biopolímero foi notável, combinado com o efeito do excesso de soluto.

Garcia-Casas et al. (2019) trabalharam com impregnação/deposição supercrítica, usando o dióxido de carbono como solvente, para impregnação/deposição de grânulos de sílica porosa com a quercetina, um antioxidante natural. Esses métodos envolviam impregnações supercríticas em batelada e semicontínuas. Os primeiros experimentos realizados em batelada, modo *batch*, ajudaram a entender a influência da pressão, temperatura, duração e presença de um co-solvente na eficiência de impregnação/deposição. Um co-solvente foi adicionado devido à baixa solubilidade da quercetina em CO₂ supercrítico, nas condições operacionais estudadas (pressão de 10 e 20 MPa, temperaturas de 35 °C e 50 °C e tempo de impregnação/deposição de 30 minutos a 17 horas). Nas faixas de temperaturas e pressões estudadas, as melhores condições

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

de operação, ou seja, aquelas que levaram à maior quantidade de quercetina impregnada (300 µg de quercetina por g de sílica), foram 10 MPa e 50°C com etanol como co-solvente para 2 h. Essas condições operacionais, destacadas por meio dos experimentos em modo *batch*, foram posteriormente aplicadas ao processo semicontínuo. Esta abordagem forneceu uma taxa de impregnação/deposição de 240 µg de quercetina por g de sílica.

Silva et al., (2016) utilizaram SSI/SSD para impregnar óleo de borragem em membrana de poliuretano. Os ensaios foram no modo estático durante 3 horas de processo, sendo realizados entre 35 e 55 °C, numa faixa de densidade de 650 a 850 kg.m⁻³ e taxa de despressurização de 1 MPa.min⁻¹. O maior rendimento do processo foi de 132 µg/mg, representando 11,8 % (m/m), processando nas seguintes condições de processo: densidade do scCO₂ igual a 850 kg.m⁻³ e temperatura de 55 °C.

Outro trabalho com polímero sintético usando o SSI/SSD foi o de Bastante *et al.*, 2017, onde foram impregnado/depositados bioativos do extrato de folha de oliva (*Olea europea*) e ácido caféico, em polímero sintético tipo filme, de polietileno tereftalato (PET) e polipropileno (PP), com espessuras entre 12 e 50 µm. A taxa de despressurização, de 1 e 100 bar/min, foi o segundo fator de maior influência na eficiência do processo, ficando atrás apenas das temperaturas (35 e 55 °C), que predominou, sendo que a melhor condição do processo foi a 35 °C e taxa de despressurização de 100 bar/min. As pressões de 100, 200, 300 e 400 bar não apresentaram uma relação clara de sua influência na eficiência geral do processo. Porém, ao aumentar a pressão, houve uma tendência crescente na eficiência antioxidante do extrato das folhas de oliva impregnado/depositado, o que envolveu o aumento da solubilidade do extrato natural, além do inchamento da cadeia polimérica. Nesse trabalho, observou-se que o tempo de processamento de 1 hora levou a produtos com maior eficiência antioxidante, corroborando com os resultados de Yudanov e Reshetov (2006).

Na literatura, pode-se encontrar o processo SSI/SSD para impregnar/depositar, sintéticos e bioativos, em bases poliméricas (sintéticas ou biopoliméricas) nas mais diferentes combinações. A Tabela 8 (ANEXO) mostra diferentes processos de incorporação de produtos naturais em diferentes matrizes poliméricas. Entre os trabalhos analisados, as condições de processo do SSI/SSD variam. Na temperatura estão entre 35 e 80 °C, na pressão entre 9 e 40 MPa, sendo em sua grande maioria no sistema estático, em modo batelada, e usam o scCO₂ como solvente. Assim, essa tecnologia é promissora para impregnação/deposição de compostos

bioativos, de plantas medicinais, em bases biopoliméricas (AMERI et al., 2020; AREDO 2019; SILVA et al., 2018).

A copaíba é uma planta medicinal que faz parte do RENISUS, e foi escolhida nesse trabalho para que os seus compostos bioativos fossem impregnados/depositados em base biopolimérica usando os métodos SSI/SSD e imersão em solvente orgânico, por sua afinidade com os solventes scCO₂ e diclorometano e suas propriedades terapêuticas, e similaridades em processos de incorporação relatados na literatura. Foram observados os rendimentos do oleorresina e do extrato de folha impregnado/depositados nas matrizes biopoliméricas, identificando o perfil dos bioativos impregnado/depositados, e se houve alterações nas matrizes poliméricas processadas.

Diante do exposto, o presente trabalho visou estudar o produto formado por impregnação/deposição dos compostos bioativos do oleorresina ou extrato de folhas da copaíba, em curativos comerciais biopoliméricos tridimensionais, Promogran[®] e Spongostan[™], utilizando o método SSI/SSD e o método por imersão, observando a viabilidade técnica para a combinação desses materiais. Foram encontrados na literatura apenas trabalhos que incorporaram oleorresina de copaíba em biopolímeros sempre do tipo filme e realizados apenas por métodos clássicos. No presente trabalho com o SSI/SSD buscou-se realizar ajustes finos nas variáveis do processo, através da pressão e concentração inicial do produto natural, no intuito de investigar a influência nas concentrações de bioativos impregnados/depositados nas matrizes poliméricas. Além disso, não foram encontrados trabalhos com as folhas de *Copaifera luetzelburgii* na literatura.

CAPÍTULO 3. METODOLOGIA

3.1. Introdução

Esse capítulo apresenta os principais reagentes e materiais utilizados, bem como faz a descrição detalhada da técnica de impregnação/deposição SSI/SSD a ser aplicada ao sistema scCO₂/oleorresina de copaíba/curativo biopolimérico e do método clássico de impregnação/deposição por imersão em líquido, utilizando solvente orgânico. São descritos os métodos analíticos empregados na caracterização dos curativos biopoliméricos (tipo espuma 3D) antes e depois da impregnação/deposição com extrato das folhas ou oleorresina de copaíba.

3.2. Material

O dióxido de carbono (99,9%) e o nitrogênio (99,9%) foram adquiridos da Praxair (Espanha). Os curativos comerciais utilizados foram o Promogran[®] (Jonhson & Jonhson, USA) e o Spongostan[™] (Ferrosan, Dinamarca), obtidos através de doações. As partes aéreas de *Copaifera luetzelburgii* foram coletadas em Barreira, Bahia, Brasil (lat: -10.16667, long: -44.86667 WGS84). O espécime do *voucher* foi identificado pelo Dr. Jorge A.S.C. e depositado no Herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), com o código de registro CEN21705. As folhas foram limpas e estabilizadas por secagem à temperatura ambiente, depois trituradas por um moinho (Laboratório Thomas Wiley, modelo 4) e armazenadas em local limpo e seco. O oleorresina de copaíba foi coletada por extrativismo na cidade de Cuiabá - MA, sendo retirada com o auxílio de um trato na região do caule, em seguida foi armazenada em recipiente de polipropileno. Essa oleorresina foi doada pelo Laboratório de Pesquisa de Material Médico (LAPEMM) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os seguintes reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA): sulfato de potássio (99%), cloreto de lítio (99%), padrão de β-cariofileno (70%), acetato de etila (99%). O hexano (99%) foi fornecido pela Qhemis[®] (São Paulo, Brasil) e o diclorometano (99%) pela Fmaia[®] (Belo Horizonte, Brasil).

3.3 Obtenção de extrato hexânico das folhas de *Copaifera luetzelburgii* e caracterização fitoquímica

As folhas de *C. luetzelburgii* (300 g) foram maceradas em 6 L de hexano (HXN) sendo mantidas em imersão no solvente orgânico por 7 dias. Esse solvente, devido à sua baixa polaridade, foi utilizado para extração dos bioativos hidrofóbicos, os terpenos. Em seguida, as

etapas de filtração e concentração sob pressão reduzida foram realizadas usando evaporador rotativo (modelo RV 10 Basic) a 40 °C. O processo de maceração foi realizado 3 vezes consecutivas. Para triagem inicial foram realizados ensaios fitoquímicos para identificar a presença de alcaloides, polifenóis e compostos policíclicos, tais como esteroides, politerpenóides e compostos voláteis. Dessa forma, foram usados como reveladores o Dragendorff, o cloreto férrico, os reagentes de Liebermann-Burchard e o anisaldeído, analisados por cromatografia em camada fina (TLC). A mistura de solventes HXN/ acetato de etila (8:2) foi usada como fase móvel e placas de sílica gel 60F (Merck, Alemanha) também foram usadas no comprimento de onda UV (365 nm) (ALVES et al., 2017; TRINDADE et al., 2019).

As análises por espectrometria de massa por cromatografia gasosa (GC-MS) foram realizadas com extrato de folha de copaíba e oleorresina. As análises GC-MS foram realizadas usando uma cromatografia Shimadzu (QP-2010, Japão), equipada com coluna capilar EN5MS (30 mm × 0,25 mm × 0,25 mm) SGE Analytical Science, operada no modo de ionização (EI) 70 eV e o gás portador de hélio estava a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min, para oleorresina, e 1,3 mL/min, para extrato de folhas. Os ensaios realizados para oleorresina com uma razão de partição de 1:60, com temperatura de aquecimento iniciada em 60 °C, mantidos por 5 min, passando de 60 para 240 °C a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min, mantidos por 15 min; para o extrato de folhas, com uma razão de partição de 1:10, a temperatura de aquecimento começou a 60 °C, mantida por 5 min, subindo de 60 para 310 °C a uma taxa de aquecimento de 15 °C/min, mantida por 15 min. A temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C, enquanto o volume injetado foi de 1 µl para todas as amostras. Todos os componentes foram identificados comparando seus dados de retenção de GC com as bibliotecas Wiley7, FFNSC 1.3 e NIST08, bem como as citadas na literatura. Os índices de retenção de terpenos foram calculados usando soluções padrão de n-alcane (C8-C20) disponíveis na Fluka S. A, nas mesmas condições cromatográficas.

3.4 Ensaios antibacterianos com extrato hexânico das folhas de *Copaifera luetzelburgii* e oleorresina da copaíba

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de ágar de difusão em disco com discos de filtro de papel com 6 mm de diâmetro

Testes biológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da faculdade de Farmácia da UFBA, avaliando a atividade do extrato de folhas de copaíba e oleorresina contra cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC), das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os testes foram realizados baseados no “Método de disco-difusão” (EUCAST, 2017), com adaptações de acordo com Morelli et al., (2015), para discos de papel impregnados/depositados com compostos bioativos oriundos de produtos naturais. As duas soluções incorporadoras dos testes foram preparadas com 100 mg de extrato de folha de copaíba ou oleorresina, dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os discos foram impregnados/depositados com alíquotas de 5 µL da solução de teste, com uma quantidade de 4 mg de extrato de folha de copaíba ou oleorresina para bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e 8 mg para bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MARAGON et al., 2017). Entre as aplicações, os discos foram secos em estufa a 45 °C por 5 minutos (SILVA et al., 2010). A quantidade de extrato de folha de copaíba ou oleorresina utilizada nos discos impregnado/depositados foi baseada na literatura (MARAGON et al., 2017; MORELLI et al., 2015; TOBOUTI et al., 2017). As suspensões microbianas foram preparadas colocando unidades formadoras de colônias (UFC) em 5 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,9%), onde as suspensões bacterianas foram padronizadas de acordo com a escala de McFarland (0,5). As soluções foram então inoculadas em uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton usando uma zaragatoa estéril. Após a inoculação, os discos foram recolhidos com pinças e as placas foram incubadas em condições aeróbicas a 37 °C por 24 h. Os diâmetros (mm) das zonas de inibição do crescimento microbiano foram medidos utilizando uma régua milimetrada. Discos inoculados, com os solventes orgânicos utilizados nas soluções de extrato, foram adotados como controle negativo. As 10 UI do antibiótico penicilina (PEN) e 5 µg de ciprofloxacina (CIP) foram usadas como controles positivos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Todo o material foi esterilizado sob luz UV a 400 - 320 nm por 30 minutos.

3.5 Solubilidades do oleorresina e do extrato hexânico de folha de *Copaifera Luetzelburgii* em solventes orgânicos

Foram estudadas as solubilidades do curativo biopolimérico Spongostan™, do oleorresina e do extrato de folha em solventes orgânicos. Inicialmente, observou-se que o biopolímero seria solúvel nos solventes orgânicos utilizados no trabalho. Assim, amostras de 1 cm³ de biopolímero foram imersas em recipientes diferentes, um contendo HXN e no outro diclorometano (DCM), ambos por 24 horas, a 25 °C, seguidos por evaporação dos solventes e pesagem das massas das amostras de biopolímeros secas obtidas, avaliando se houve alteração na massa inicial do biopolímero. Essa análise foi feita em triplicata.

Para estudar as solubilidades do extrato de folhas e do oleorresina da copaíba em solventes orgânicos foi aplicado o método do ponto de nuvem (MONSEN-NIA et al., 2009). Para isso, trabalhou-se na faixa de massa de 10 a 90 %, do oleorresina ou do extrato de folhas nos solventes HXN ou DCM, onde quantidades de extrato de folhas foram adicionadas progressivamente e misturadas a HXN, e em outro recipiente com DCM, observando-se se ocorria o ponto de saturação da solução (uma fase), sendo aquecidos a 35 °C em sistema hermético, o mesmo ocorreu para o oleorresina e o HXN e DCM. O ponto de nuvem foi determinado mudando de solução líquida homogênea para mistura bifásica heterogênea. Os aspectos das amostras foram classificados em líquido transparente (LT) e sistema bifásico (BS). Logo após o preparo, as soluções homogêneas foram armazenadas por 72 horas, para observar mudanças de fase a partir da condição de equilíbrio.

Outro teste de solubilidade foi realizado pelo método do índice de refração. As amostras foram colocadas em um sistema hermético com diferentes frações de massa (0 a 100%). Em seguida, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico (Ultronique, Brasil) por 5 minutos, e seus índices de refração foram medidos a 25 °C (banco Quimis Abbe, Brasil) (LI et al., 1994). Para analisar a solubilidade do oleorresina de copaíba nos solventes orgânicos HXN e DCM, foram construídos gráficos do índice de refração (n) versus fração da massa de óleo (x).

3.6 Método clássico de impregnação/deposição usando líquido volátil, dos bioativos da copaíba em base biopolimérica

O extrato da folha de copaíba e o oleorresina foram impregnado/depositados na matriz biopolimérica por imersão em solvente orgânico DCM, de acordo com método de impregnação/deposição descrito anteriormente na literatura (BRAGA et al., 2008, COSTA et al., 2010; MORELLI et al., 2015). A preparação inicial da solução contendo substâncias bioativas para impregnação/deposição foi realizada considerando os estudos de solubilidade (métodos descritos na seção 3.5). Inicialmente, 300 mg de amostra (extrato de folha ou oleorresina) foram colocados no fundo da célula de impregnação/deposição de vidro e suplementados com 15 mL de DCM. O sistema foi selado hermeticamente, aquecido a 35 °C e colocado em banho ultrassônico (Ultronique, Brasil) por 10 minutos. As amostras de curativo SpongostanTM (1 × 1 × 0,8 cm³) foram imersas na solução de impregnação/deposição por 3 horas, a 35 °C, mantidas sob agitação (700 rpm) em sistema fechado. As amostras de curativos foram retiradas da solução de impregnação/deposição e secas a 25 °C, sob pressão atmosférica, durante 72 horas para remoção do solvente.

3.7 Métodos de impregnação/deposição SSI/SSD de bioativos da copaíba em bases biopoliméricas

Para os ensaios experimentais de SSI/SSD, foram utilizadas quantidades de oleorresina de copaíba pré-definidas de 100 ou 200 mg, sendo colocados na parte inferior da célula de alta pressão como primeira etapa do processamento. Esses valores foram escolhidos levando em consideração a predição da solubilidade (ROSA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016) do oleorresina de copaíba em scCO₂ (BOTELHO *et al.*, (2015) e do composto bioativo β-cariofileno (MICHIELIN et al., 2009), além do volume da célula de impregnação/deposição.

A Figura 30 (ANEXO) mostra a montagem da célula de impregnação, onde as amostras dos curativos da Promogran[®] (1x1x0,2 cm³) e SpongostanTM (1x1x0,8 cm³) receberam um pré-tratamento antes da realização do SSI/SSD, foram cortadas com bisturi para a padronização das áreas de superfície (1 cm²), mantendo as espessuras originais dos curativos comerciais. Em seguida, as amostras biopoliméricas foram expostas em atmosfera controlada com umidade relativa (UR) igual a 20%, em um dessecador contendo cloreto de lítio, durante 24 horas. Essa ação buscou inchar/aumentar os poros dos biomateriais para aumentar o rendimento de bioativos impregnado/depositados. Em seguida, as amostras dos biopolímeros foram colocadas com o auxílio de uma pinça dentro da célula de impregnação/deposição (5) na posição vertical (de modo a evitar a deposição do material na etapa de despressurização do sistema), para formar

o sistema biopolímero/scCO₂/bioativo. Nessa etapa, após a estabilização do SSI/SSD, o solvente CO₂ passou para a fase rica no solvente supercrítico, responsável por solubilizar o bioativo presente na parte inferior da célula, e a matriz polimérica permaneceu suspensa no interior da célula (BRAGA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

O sistema de processamento de impregnação/deposição dos bioativos da copaíba em matrizes sólidas porosas, usando tecnologia de fluido supercrítico de dióxido de carbono (SSI/SSD), é ilustrado na Figura 6, sendo descrito previamente na literatura (BRAGA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2006, EP1611877). O sistema foi composto por um cilindro de CO_{2(1+v)} nas condições de pressão interna do cilindro que variou de 60 a 70 bar e temperatura do ambiente que variou de 20 a 25 °C estando assim nas fases líquido-gasoso (Figura 7A). O cilindro contém uma válvula de alta pressão (2) responsável pela liberação do CO₂, que é levado à bomba na condição de líquido subresfriado (3) (a uma temperatura de -15 °C), para evitar a cavitação da bomba (Figura 6). Ainda na bomba (3), o CO_{2(l)} é comprimido em diferentes pressões (137, 190 e 317 bar), e em seguida bombeado para célula de impregnação/deposição (5), de aço inoxidável, com volume interno de aproximadamente 22,9 cm³ (altura 7,3 cm e diâmetro 2 cm). O CO_{2(l)} que está na linha (pressão de 3 bar) é retirado fazendo uma purga no sistema. Essa etapa auxilia na retirada do O_{2(g)} que pode estar dentro da célula de impregnação/deposição (5). A pressão do interior da célula é medida por um manômetro digital de alta pressão (4), e a faixa de pressão escolhida do CO₂ (137 a 317 bar) foi baseada em valores previamente relatados na literatura (BRAGA et al., 2008; BOTELHO et al., 2015; DIAS et al., 2013; SILVA et al., 2016). A célula de impregnação/deposição fica sobre uma placa de agitação magnética (6) para homogeneização do fluido incorporador (óleo copaíba + scCO₂) dentro da célula. Além disso, a célula de impregnação/deposição é submersa em um banho termostático de ar, que tem a temperatura controlada por um termostato digital (7). Para os ensaios experimentais do SSI/SSD, a temperatura do sistema foi limitada (31 °C < T < 50 °C). O limite superior foi baseado na estabilidade térmica das amostras de curativos comerciais biopoliméricos (método descrito na secção 3.8), para evitar o fenômeno térmico de desnaturação proteica das matrizes sólidas porosas e/ou o fenômeno de redução da atividade terapêutica dos bioativos termosensíveis e voláteis da copaíba. Já o limite inferior, é a própria temperatura crítica do CO₂, garantindo que os experimentos ocorram com o dióxido de carbono na condição supercrítica, ou seja, acima do ponto crítico (T_c = 31 °C e P_c = 72,9 atm). Assim, todos os experimentos de SSI/SSD foram realizados na isoterma de 45 °C, valor previamente encontrado em trabalhos da literatura (que em geral variam de 40 a 50 °C) para

processamentos SSI/SSD usando matrizes sólidas de composição proteica e bioativos fitoterápicos (BASTANTE et al., 2017; DIAS et al., 2013; SILVA et al., 2016; SANCHEZ et al., 2017). O CO₂ dentro da célula de impregnação/deposição, ao atingir as condições de pressões (de 137, 190 ou 317 bar) na temperatura de 45 °C, passa para o estado de fluido supercrítico com as respectivas densidades de 701,01, 801,53 e 900,01 kg/m³. Essa faixa de densidade do scCO₂ foi escolhida por ser previamente estudada na literatura (BASTANTE et al., 2017; BRAGA et al., 2008; DIAS et al., 2013; MICHIELIN et al., 2009), pois é uma região termodinâmica em que o CO₂ possui uma densidade mais próxima dos líquidos (Figura 7B).

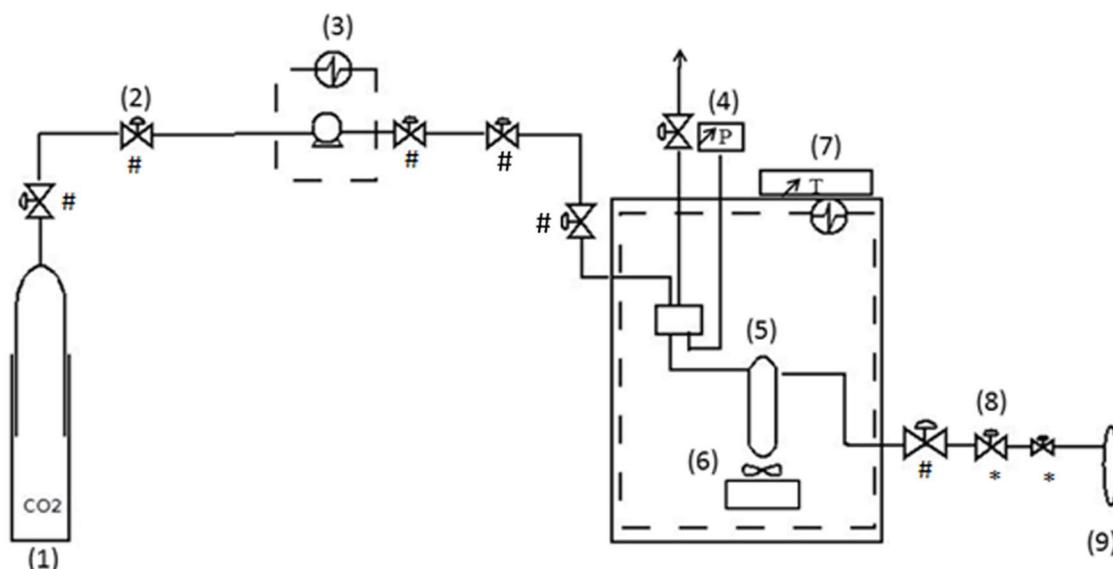


Figura 6. Representação esquemática do sistema de impregnação/deposição, utilizando CO₂ supercrítico, que é composto por um cilindro de CO₂ (1), válvulas de alta pressão de agulha (#) e válvulas micrométricas (*) (2), uma bomba condicionada em manta térmica (3), manômetro digital (4), célula de impregnação/deposição (aço inoxidável) para processos de alta pressão dentro de banho termostático de ar (5), agitador magnético (6), termostato digital (7), válvulas de alta pressão de agulha de precisão (#) e válvulas micrométricas (*) (8), vaso coletor do CO_{2(g)} (9).

Os valores de densidade foram encontrados nos dados disponibilizados pelo *National Institute Standards and Technology* (NIST, <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>), que através das propriedades termofísicas de sistemas fluidos (combinação de pressão e temperatura do CO₂) é capaz de calcular a densidade do scCO₂. Os valores de pressão utilizados foram previamente avaliados na literatura. Para valores abaixo de 140 bar, predomina a influência da pressão de vapor dos bioativos e a densidade do solvente, e para os valores acima, predomina a influência apenas da pressão de vapor (BOTELHO et al., 2015).

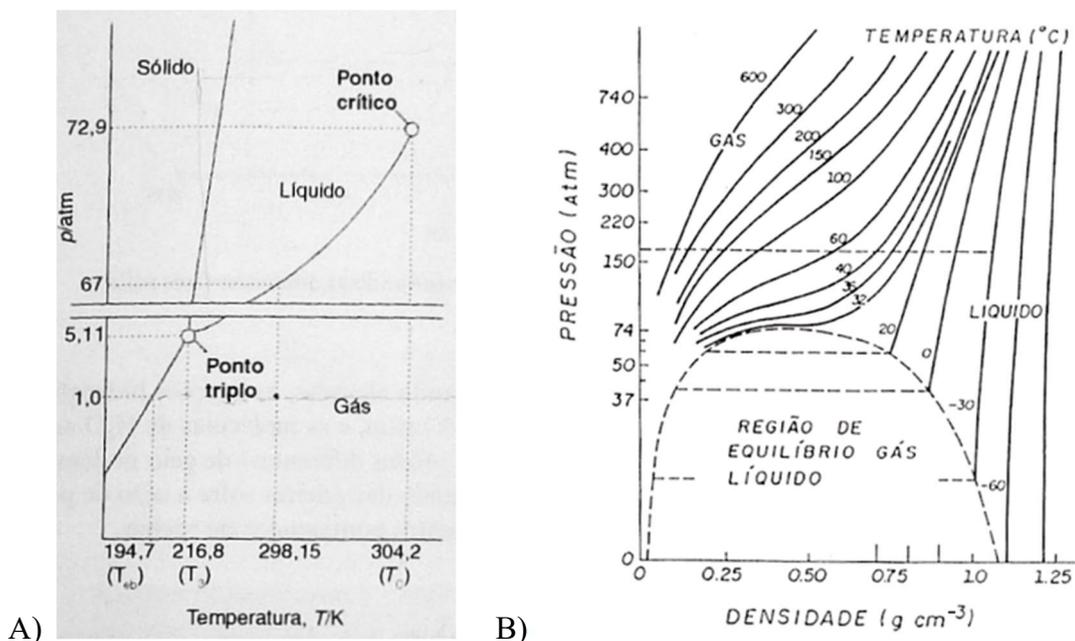


Figura 7. A) Diagrama de fases do dióxido de carbono. B) Dependência da densidade de CO₂ com a pressão e a temperatura (Fontes: ATKINS, 2008; CARRILHO et al., 2001).

A última etapa do SSI/SSD foi caracterizada pela despressurização do sistema, feita pela abertura das válvulas de ajuste fino (*) (8). Nessa etapa, o CO₂ passou do estado supercrítico para o estado gasoso, com uma taxa de despressurização controlada manualmente, através do ajuste fino das válvulas micrométricas e com o auxílio de um cronômetro. A taxa de despressurização foi de 5 bar/min, a mesma utilizada por Silva et al., (2018) para o sistema Promogran/scCO₂. O dióxido de carbono, após sair da célula de impregnação/deposição, foi para um recipiente contendo água (9). O tempo de processamento estático (3 horas) foi mantido para todos os experimentos. Este valor foi previamente utilizado em sistemas semelhantes por Dias et al. (2013), Silva et al. (2016) e Yudanova e Reshetov (2008). O sistema de impregnação/deposição utilizada nessa tese é apresentado na Figura 32 (ANEXO).

Devido à escassez de dados de solubilidade da oleorresina em scCO₂ na literatura, a presente tese utilizou os dados de Botelho et al. (2015), como aproximação inicial para calcular a solubilidade do oleorresina no scCO₂ nas condições operacionais do SSI/SSD. Mesmo sendo bem diferentes os produtos naturais fitoterápicos em estudo (oleorresina e extrato de folhas), foi considerada a semelhança química dos compostos bioativos da matéria vegetal. Botelho et al. (2015) realizaram a produção de extratos de folhas de copaíba, usando fluido supercrítico tendo como condições do método: 10-30 MPa de pressão, 40-60 °C de temperaturas, 280-910 kg/m³ de densidade do scCO₂ e 1-3 h tempos), onde os rendimentos dos extratos secos em

função da pressão e densidade do scCO₂ são mostrados na Figura 8. A partir desses valores de Botelho et al. (2015) foi predita valores aproximados para a solubilidade do oleoresina de copaíba em scCO₂ (kg/m³) usado nessa pesquisa, para o método SSI/SSD descrito na Figura 6. Inicialmente a solubilidade foi calculada a partir da razão do rendimento da massa seca total, de extrato de folha (kg) pelo volume total de scCO₂ (m³), usando as condições de temperatura e densidade do solvente do método de Botelho et al. (2015). A massa total de scCO₂ foi calculada pela razão da vazão mássica de scCO₂ (mg.s⁻¹) pelo tempo total de extração (9000 s). O volume total de scCO₂ foi calculado, pela razão de massa total de scCO₂ pelas densidades do scCO₂. Assim, foi estimado os valores de solubilidade do oleoresina de copaíba em scCO₂ nas condições do método de Botelho et al. (2015). Para correlacionar os valores de solubilidades para as condições do método SSI/SSD (Figura 6), utilizou-se os valores de solubilidade estimada na equação do modelo Chrastil (Eq. 1), o qual correlaciona a solubilidade de um sólido solúvel em um sistema binário, em função da densidade do solvente e da temperatura absoluta (ROSA *et al.*, 2015).

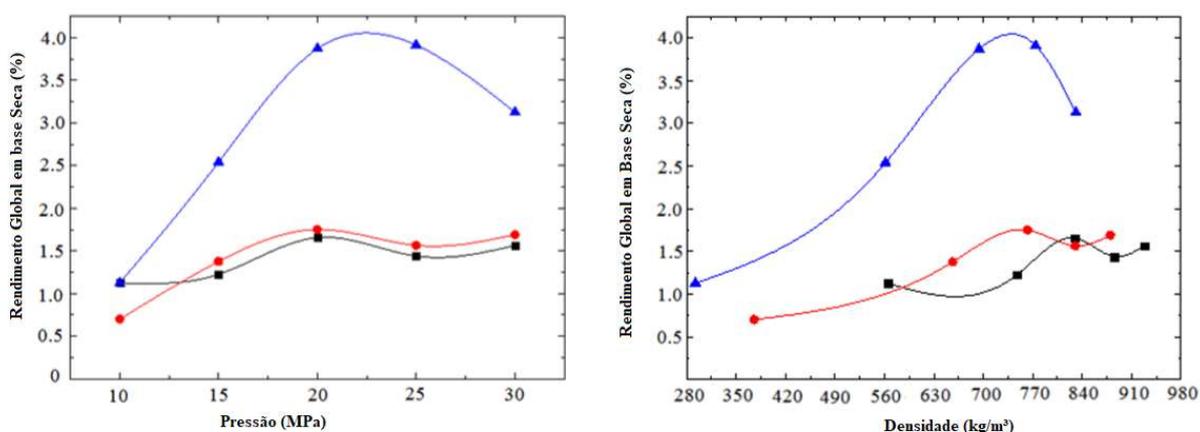


Figura 8. Rendimento em base seca da extração das folhas de copaíba usando CO₂, em função da pressão e da densidade. Isotermas de (■) 40 °C, (●) 50 °C and (▲) 60 °C (Fonte: BOTELHO et al., 2015).

Pesquisas usando fluidos supercríticos vêm buscando desenvolver modelos matemáticos, através de equações empíricas, equações de estado e simulação molecular, no intuito de aperfeiçoar a tecnologia do processo e ter dados de diferentes solutos, em diferentes condições de processo. A correlação de *Chrastil* tem se destacado para sistemas binários, apresentando resultados satisfatórios para o cálculo solubilidade de um sólido no solvente supercrítico, em geral scCO₂, em função da densidade do solvente puro e da temperatura absoluta (CABEZA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016; TABERNERO *et al.*, 2014), expressa pela Eq. 1.

$$S = \rho^{\kappa} \cdot \exp\left(\frac{\alpha}{T} + \beta\right) \quad (1)$$

onde S [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$] representa a solubilidade do soluto em scCO_2 , ρ [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$] representa a densidade do scCO_2 puro para uma pressão e temperatura experimental, e κ é um número associado. O parâmetro α é definido como a soma de entalpia de vaporização e solvatação dividido pela constante do gás (R), e β é outra constante relacionada as massas moleculares do soluto e solvente. Os parâmetros α , β e κ do modelo são obtidos realizando uma regressão linear múltipla dos dados de solubilidade usando o software Microsoft Excel 12.0 (Office 2007) (ROSA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016; TABERNERO *et al.*, 2014).

A Eq. 1 recebeu o tratamento matemático de linearização formando a Eq. 2. Para utilizar o modelo de Chrastil, o comportamento termodinâmico do sistema em alta pressão foi considerado binário (óleo de copaíba + scCO_2), assumindo-se que as interações moleculares entre biopolímero e soluto não afetam o processamento do sistema. Além disso, o oleorresina de copaíba (que é uma mistura complexa) foi considerado um pseudocomponente dos seus principais compostos majoritários, os terpenos (BRAGA *et al.*, 2015; MASCHIETTI, 2011; MICHIELIN *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2015; TABERNEIRO *et al.*, 2014).

$$\ln S = \kappa \ln(\rho) + \frac{\alpha}{T} + \beta \quad (2)$$

Esses parâmetros foram utilizados para interpolar os valores de solubilidade do oleorresina de copaíba no solvente scCO_2 , para as condições experimentais do SSI/SSD desse trabalho. Esses valores de solubilidade estimados foram usados para determinar o valor do coeficiente de partição. Este foi calculado pela razão do valor médio da massa (kg) de óleo de copaíba impregnada/depositada nos curativos e o valor médio de massa predita de óleo de copaíba solubilizada em scCO_2 (kg/m^3), para o volume de scCO_2 dentro da célula, considerando a densidade do método.

3.8 Caracterização físico-química das amostras

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (Jasco, modelo 4200-ATR, UK) foi realizada nas condições 256 *scans* com resolução de 4 cm^{-1} , entre 500 e 4000 cm^{-1} . Os curativos comerciais (não-processados), os curativos processados por SSI/SSD, por imersão em solvente orgânico, o extrato da folha e o oleorresina de copaíba foram analisados.

Capítulo 3. Metodologia

As análises termogravimétricas (SDT Q600 TA, Instrument, New Castle, DE, USA) foram realizadas em simultâneo (DSC/TGA), para verificar a estabilidade e a degradação física e química das amostras nas condições do processamento. As amostras foram mantidas em atmosfera controlada, na umidade relativa (UR) de 20% por 24 horas, antes das análises térmicas, para uniformizar a umidade das amostras. Os ensaios de estabilidade térmica dos curativos foram realizados nas temperaturas de 40 e 45 °C, em uma taxa de aquecimento constante, em atmosfera de nitrogênio, para 900 minutos. Para as análises de degradação térmica foram as seguintes condições: a faixa de temperatura foi de 25 até 600 °C, com uma taxa de aquecimento constante de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Os ensaios de sorção de vapor de água (SVA) foram realizados com as amostras (1 cm x 1 cm²) previamente secas em estufa (40 °C), e mantidas a 90 % UR em um dessecador contendo cloreto de potássio, a uma temperatura constante de 37 °C por oito horas. Todas as amostras foram pesadas em intervalos de tempo pré-determinados de 60 min, a onde a massa foi medida por diferença gravimétrica. A sorção de vapor de água foi calculada pela Eq. 3:

$$SVA = \frac{(Mf - Mi)}{Mi} \times 100 \quad (3)$$

onde Mf = massa inicial (mg) da membrana seca e Mi = Massa final (mg) medida em cada intervalo de tempo pré-determinado.

As análises de porosidade das amostras foram pelo método de adsorção de azoto (Micromeritics, modelo PAEA 2000, 20Q-34001-01), baseado na determinação das áreas de superfícies, os volumes e os diâmetros médios dos poros. As áreas de superfícies foram determinadas pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), enquanto os volumes dos poros e o diâmetro médio dos poros pelo método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Para caracterização dos meso e macroporos foram determinados por porosimetria de intrusão de mercúrio (Micromeritics, Autopore IV 9500) baseado na determinação do diâmetro médio dos poros, a porosidade, densidade aparente e a *bulk density*. A densidade real foi determinada por picnometria de hélio (Quanta-chromium, MPY-2). Todas as amostras foram mantidas em dessecador com atmosfera de 20% UR (solução saturada de cloreto de lítio) durante 24 horas, antes das análises de porosidade. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

As imagens dos curativos não processados e dos curativos processados pelo método SSI/SSD e pelo método de imersão em solvente orgânico, foram geradas pelo microscópio de

varredura eletrônica (MEV) da marca JEOL (modelo JSM-5310, Japão). As análises foram realizadas a 5kV em diferentes magnitudes. Todas as amostras foram revestidas com ouro (aproximadamente 300 Å) em atmosfera de argônio. O coeficiente de deformação normal (ε) dos diâmetros porosos da matriz 3D foi calculado por microscopia eletrônica de varredura de mesa. O ensaio avaliou os efeitos do processo de impregnação/deposição por imersão em líquido, na organização arquitetônica SpongostanTM. As micrografias foram realizadas com as mesmas amostras, antes e após a impregnação/deposição com solvente orgânico dos compostos de copaíba, utilizando um equipamento Hitachi (modelo T3000, Japão), a 15 kV, com ampliações de 50× e 100× e diâmetro médio poroso da matriz 3D. O software TM3000 (Japão) permite calcular a deformação usando a Eq. 4:

$$\varepsilon (\%) = \frac{\delta}{L} \times 100 \% \quad (4)$$

onde ε , δ e L são a deformação, a variação da dimensão dos diâmetros porosos e a dimensão inicial dos diâmetros porosos, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.9 Caracterização do extrato de folha e oleorresina impregnado/depositado

As quantidades de extrato de folha e oleorresina de copaíba impregnado/depositados/depositados nas amostras dos biopolímeros foram calculadas pelo método de quantificação gravimétrica (%) dos valores liberados em solvente orgânico. Para este ensaio, inicialmente foi realizado um pré-teste para determinar a solubilidade dos biopolímeros (Promogran[®] e SpongostanTM) em hexano e diclorometano, onde as amostras das matrizes poliméricas (de massa conhecida) foram imersas em um frasco de vidro contendo 10 mL de hexano, e mantidas em recipiente fechado numa temperatura de 37 °C, durante 24 horas. Em seguida, os ensaios de quantificação gravimétrica foram realizados, onde cada amostra processada e incorporada com extrato de folha ou oleoresin de copaíba foram colocadas em recipientes de vidro, e com auxílio de uma pipeta automática foram adicionados 5 mL de hexano aos recipientes, que foram fechados e colocados em agitação durante 1 hora, na temperatura de 37 °C. Após esse intervalo o solvente era retirado com auxílio da pipeta automática e transferido para um frasco de vidro identificado, de massa previamente conhecida. Essa etapa foi repetida 4 vezes, para garantir que o solvente renovado retirava todo o extrato de folhas ou oleorresina incorporado. Em seguida as amostras foram submetidas à capela para evaporação do solvente

orgânico das soluções liberadas (extrato de folha + hexano ou óleo liberado + hexano). Após evaporação do solvente e massa constante, foi feita a quantificação do óleo impregnado/depositado e liberado em solvente orgânico (DIAS et al., 2013).

As análises de cromatografia gasosa (CG-FID) do oleorresina de copaíba e do óleo impregnado/depositado nos curativos Promogran[®] e Spongostan[™] foram conduzidas nos laboratórios da Universidade de Coimbra, usando um CG-FID Finnigan-Tremetrics (modelo 9001, USA), equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 mm × 0,35 mm × 0,25 mm). As soluções foram preparadas com solvente (acetato de etila) na concentração 5 mg/ml. O gás de arraste foi o Hélio, a uma vazão igual de 1,7 mL/min. As condições de análise foram: temperatura inicial de 30 °C durante 5 min; de 30 a 300 °C com taxa de aquecimento de 5 °C/min; temperatura do injetor e detector igual a 240 °C; razão split 1/20 e temperatura final 300 °C por mais 5 min (NASCIMENTO et al., 2012). O β-cariofileno, composto majoritário do óleo de copaíba, foi identificado e quantificado utilizando padrão externo, através da construção de uma curva de calibração com seis diferentes concentrações: 1,50 µg/ml, 4,64 µg/ml, 7,78 µg/ml, 10,92 µg/ml, 14,06 µg/ml, e 17,20 µg/ml, todas injetadas em triplicata para um coeficiente de variação < 10 %. Para as amostras, o volume injetado foi de 5 µl, todas realizadas em duplicata.

As principais substâncias voláteis do óleo de copaíba foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada a um espectro de massa (CG-EM) com um equipamento Agilent (modelo 7890 A, USA), usando os mesmos programas de referência para avaliar as datas base do NIST e FFNSC 2 (Wiley). A fragmentação de moléculas no espectrômetro de massas foi obtida por ionização por impacto de elétrons (EI) com energia de 70 eV. A identificação dos picos dos produtos voláteis das amostras foi realizada por comparação dos seus espectros de massa com os espectros da base de dados referência do NIST e FFNSC 2 (Wiley). A quantificação foi expressa como áreas totais e compostos de cada pico.

Todos os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do oleorresina de copaíba ou extrato de folha foram adquiridos usando um espectrômetro Bruker NMR (AVANCE III HD, EUA) nas seguintes condições: 500 MHz e 100 MHz para ¹H e ¹³C e, clorofórmio-D foi usado como referência para os sinais de solvente residual. Os espectros de bioativos da copaíba (oleorresina e extrato de folha) foram comparados com os espectros citados na literatura (SANTOS et al., 2019).

Capítulo 3. Metodologia

Os dados foram submetidos à análise de variância através da estatística descritiva. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias (*t student* e Turkey) no software ASSI/SSDSTAT (2015) versão 7.7 beta. Para comparação das amostras na atividade antibacteriana foi realizado o teste de Kruskal-Wallis nos níveis de 5 % de significância. A hipótese nula (H0) é que as amostras são provenientes da mesma população.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Introdução

Entre outubro de 2014 e outubro de 2015, foram realizados ensaios experimentais de impregnação/deposição supercrítica do oleorresina de copaíba em curativos comerciais SpongostanTM e Promogran[®], em escala de bancada, nos laboratórios do *Green and Sustainable Processes* (GSP), Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra. A Dra. Mara Braga foi orientadora durante os ensaios realizados. A colaboração é referente ao doutorado sanduíche financiado pela PEst-C/EQB/UI0102/2013 (Portugal) e FCT/CAPES (Portugal-Brasil, FCT/2650/12/3/2013/S). A pesquisa desenvolvida fez parte do projeto de cooperação internacional UFBA-Universidade de Coimbra, intitulado “Tecnologias supercríticas para o desenvolvimento de aplicações farmacêuticas e cosméticas à base de polímeros naturais e de extratos vegetais bioativos”. Esse trabalho gerou um artigo.

Os ensaios experimentais de impregnação/deposição de compostos bioativos da copaíba continuaram com o método de imersão em solvente orgânico líquido para incorporar compostos bioativos de extrato de folhas e oleorresina de copaíba no curativo comercial SpongostanTM. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Polímeros e Bioprocessos, Universidade Federal da Bahia, e as análises espectroscópicas dos produtos naturais da copaíba, extrato de folhas e oleorresina, foram feitas em colaboração com laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão-Preto (USP), do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da UFJF, e do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB.

No primeiro artigo, “*Copaiba Oil-loaded Commercial Wound Dressings Using Supercritical CO₂: A Potential Alternative Topical Antileishmanial Treatment*”, publicado no *Journal of Supercritical Fluids*, a atividade antileishmanial foi o problema patológico que motivou o trabalho, fazendo parte do título.

No segundo artigo, “*Bioactives Compounds of Copaifera sp. Impregnated into Three-Dimensional Gelatin Dressings*”, publicado no *Drug Delivery and Translational Research*, a regeneração de tecidos usando matriz extracelular como suporte e a formação de biofilmes bacterianos em feridas foram os pontos de partida do trabalho. Nesse trabalho houve o uso de técnica de ressonância magnética para avaliar os compostos bioativos impregnado/depositados no biopolímero.

Copaiba Oil-loaded Commercial Wound Dressings Using Supercritical CO₂: A Potential Alternative Topical Antileishmanial Treatment

D.R.C. Pascoal^a, E.C.M. Cabral-Albuquerque^a, E.S. Velozo^b, H.C. de Sousa^c, S.A.B.
Vieira de Melo^a, M.E.M Braga^c

*^aEscola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Rua Aristides Novis, 2, 6º andar,
Federação, 40210-630, Salvador, Bahia, Brasil*

*^bDepartamento de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo,
s/n, Ondina, 40170-115, Salvador, Bahia, Brasil*

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

Abstract

Cutaneous leishmaniasis is a tropical disease which main treatment indicated by World Health Organization (WHO) is parenteral pentavalent antimony application; however the widespread usage of this drug is limited due to its toxicity, low efficiency and cost, and also requires medical assistance for application. Topical treatment is proposed using wound dressings with controlled drug delivery against cutaneous leishmaniasis, since dressings can control the water and oxygen permeability necessary for wound healing. This way, commercial wound dressings based on biopolymers (Spongostan[®] and Promogran[®]), were loaded with copaiba oil using supercritical solvent impregnation/deposition (SSI/SSD) as an alternative topical antileishmanial treatment. SSI/SSD experimental runs were carried out at 45 °C and for supercritical CO₂ (scCO₂) densities of 701, 801 and 900 kg/m³. Results show that process conditions affect the oil impregnation with improvement of from 1.4 up to 3.8 times. The biopolymers affinities with copaiba oil, the sorption of scCO₂ in the biopolymers and copaiba oil solubility in scCO₂ were shown to be important factors for the studied systems. Spongostan[®] had improved its thermal stability, probably promoted by the copaiba oil plasticizing effect during the process. The main compound found in copaiba oil, β -caryophyllene, which presents leishmanicidal and anti-inflammatory activities, was successfully loaded using scCO₂ in both wound dressings, and showed to be promising to further analysis on leishmaniasis wound.

Keywords: *Copaifera sp.* oil, β -caryophyllene, supercritical solvent impregnation (SSI/SSD), biopolymers, wound dressings

Introduction

Leishmaniasis is a tropical disease caused by the protozoan *Leishmania ssp.* and transmitted by the insect vector *Lutzomyia longipalpis*. The parasite life cycle possess two main stages: first, in the insect host, at metacyclic promastigote form and second, on the infected mammalian host, in which the parasite penetrates the cells of reticuloendothelial system and is phagocytized by macrophages unable to degrade it. Then, the parasite takes a non-flagellated amastigote form inside phagolysosomes, where it reproduces and disseminates the infection

through bloodstream. Among the known four types of leishmaniasis, the cutaneous leishmaniasis can be caused by *L. tropica*, *L. major* and *L. aethiopica*. The typical symptoms include the formation of pruriginous nodules that progress to a mildly painful ulceration, round or oval shallow shaped, with raised edges, which can be granulomatous dry or exudative and reach a myiasis production of up to 10 cm of diameter, generally associated to a lymphangitis close to the injury [1-3].

The WHO guidelines indicate the parenteral administration of pentavalent antimony, an enzyme inhibitor drug selective of *Leishmania ssp.* as the standard treatment. Chemotherapeutic alternatives have been developed, such as lipid formulations with amphotericin B and miltefosine for oral treatment [4]. All these drugs are limited, at some extension by their toxicity, low efficacy, high cost or hospitalization demand. These observations highlight the need of investigation aiming to identify alternative treatments, that could be effective in the early stages of the disease [2, 3, 5].

In this perspective, studies have been conducted to develop treatments with systems capable of performing controlled release of effective anti-leishmanial drugs. A controlled drug release system can be advantageous because it enable release homogeneous therapeutics rate in bloodstream, simple administration, and reduced cost of several doses applications. Work focused on drugs associated with polymeric nanoparticles for oral treatment showed antileishmanial activity [6], and several prototype vaccines are also in various stages of development [7].

Similarly, new leishmanicidal agents have been identified by using natural compounds isolated from plants and microorganisms [8-12]. Among those plants, copaiba (leaves, oil resin and pulp of the fruit) have been widely studied due to their large content of compounds with therapeutic activities [13-15]. *Copaifera ssp.* is a native Amazonian specie found in Brazil and popularly known as copaiba. Copaiba oil bioactivities have been confirmed by the presence of sesquiterpenes, diterpenes and flavonoids, which have been obtained by various techniques, including conventional extraction by organic solvent, isolation/partition with organic solvents and more recently scCO₂ extraction [16-18]. These compounds are used for oral or topical administration [19-20]. The main medicinal applications of the terpene compounds found in the copaiba oil include wound healing [21-22], anti-inflammatory [14, 19, 23], antibacterial agent [24], anticancer [15, 25] and anti-leishmanial activity against the amastigote and promastigote forms of the parasite, mainly obtained by trans- β -caryophyllene presence in copaiba oil [2, 5].

Alternative topical treatments, including wound dressings, can be an attractive approach among controlled drug release system for the cutaneous leishmaniasis treatment [26]. Taking into account that these dressings can control the permeability of water vapor and oxygen in the wound [27] and incorporate bioactive substances (anti-inflammatory and anti-microbial agents) into biopolymeric bases, they may play an effective role on the healing process [28].

The wound dressings loaded with natural compounds against cutaneous leishmaniasis could be a promising new treatment. In order to accomplish this proposal, the impregnation of biomolecules into polymeric matrices using supercritical solvent impregnation (SSI/SSD) can be far more efficient and advantageous than conventional methods based on immersion techniques by their homogeneous distribution and consequently larger action surface on wound healing. Also, the fine control of loading yield of bioactive substances by tuning operational conditions (pressure, temperature, depressurization rate and bioactive compound concentration), as well as the intrinsic advantageous properties of supercritical carbon dioxide (scCO₂), such as a solvent with low toxicity, non-flammability and mild operation temperature avoiding the drawbacks of organic solvents [29-32], can confirm the technical viability of this technology.

In this context, this study aimed at the investigation of copaiba oil loading process into commercial biopolymeric wound dressings, using scCO₂ impregnation method as proposal of topical treatment using a natural leishmanicidal.

Materials and Methods

Materials

Carbon dioxide (99.5%) and nitrogen (99.5%) were purchased from Praxair (Spain). The commercial dressings Promogran[®] (Systagenix, USA) and Spongostan[®] (Ferrosan, Denmark) were kindly donated by manufacturers. Copaiba oil resin (obtained from trunk tree) was donated by the Laboratory of Medical Matters Research (LAPEMM) at the Federal University of Bahia (UFBA). All the following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (USA): potassium sulfate (99%), lithium chloride (99%), β -caryophyllene standard (70%), hexane (99%) and ethyl acetate (99%).

Supercritical Solvent Impregnation (SSI/SSD)

The supercritical impregnation apparatus employed in this work is described in the literature [30, 32]. Briefly, it consists of a CO₂ pump, a visual high-pressure stainless steel impregnation cell (≈ 22.9 cm³), kept under stirring (700 rpm), a thermostat and a magnetic stirrer to homogenize the static system (copaiba oil + polymers + scCO₂). The Spongostan[®] (1×1×0.8 cm³) and Promogran (1×1×0.2 cm³) dressings samples were exposed to 20% relative humid (RH) atmosphere in desiccators containing lithium chloride for 24 hours. After this period, they were processed in a vertical position in order to reduce the probability of oil deposition.

The copaiba oil mass used and the operational SSI/SSD conditions were chosen taking into account the copaiba oil properties, such as the copaiba oil viscosity (around 0.01 Pa.s, in temperature of ≈ 50 °C) considering the similarities between this oil composition and the Morelli et al. (2015) samples [24], the copaiba oil [16] and β -caryophyllene [34] solubilities into scCO₂, and the thermodynamic behavior of the binary system (copaiba oil + scCO₂) at high pressure [16, 33-36]. The amount of oil employed (100 and 200 mg) was established by taking into account the available cell volume and the oil solubility in scCO₂ at the tested experimental conditions, and by using amounts in excess of the saturation solubility limit. The copaiba oil was placed in the bottom of the high-pressure cell with a magnetic bar for stirring.

Commercial dressings (Spongostan[®] and Promogran[®]) contain gelatin and collagen, respectively, and considering their denaturation around 50-55 °C, as well as the thermal stability of the dressing biopolymers measured in this work (method described in 2.3 section), the SSI/SSD experimental assays were carried out at 45 °C. Pressures varied from 132 bar up to 317 bar, in order to reach the scCO₂ densities of approximately 700, 800 and 900 kg/m³, respectively. The depressurization rate (5 bar/min) and process contact time among samples, oil and scCO₂ of 3 hours were kept for all experiments [37]. All assays were performed in duplicate.

Physicochemical characterization of the samples

Spectroscopic analyses were performed by FTIR-ATR equipment (Jasco, Model 4200, UK) at 256 scans with a resolution of 4 cm⁻¹, between 500 and 4000 cm⁻¹. The commercial dressings (non-processed), processed dressings by SSI/SSD and copaiba oil were analyzed.

Thermogravimetric analysis were performed by simultaneous DSC/TGA measurements (SDT Q600, TA Instruments, New Castle, USA) to evaluate the stability and profile of dressing

samples, as well as a degradation profile under temperature processing conditions. The samples were exposed to a 20% relative humid (RH) for 24 hours before analysis to normalize the samples humidity. The thermal stability assays were carried out at 40 °C and 45 °C, under nitrogen atmosphere, for 900 minutes. For thermal degradation analysis the temperature range was from 25 °C up to 600 °C, at constant heating rate of 10°C/min under nitrogen atmosphere. All analyses were duplicated.

Water vapour sorption (WVS) assays were performed with dressing samples (1x1 cm²) previously dried at 40 °C and kept in 90% RH desiccators containing potassium chloride for 8 hours. All samples were weighed at pre-determined time intervals of 60 min. The WVS capacity was calculated by Equation (1):

$$\text{WVS} = \left(\frac{M_t - M_o}{M_o} \right) \times 100 \quad (1)$$

where M_o and M_t are the weight at the beginning of the experiment (dried) and at time t , respectively. All assays were carried out in triplicate.

Porosity analysis of the samples were performed by means of a nitrogen adsorption equipment (Micromeritics, model ASAP 2000 20Q-34001-01), based on the determination of the surface area, pore volume and average pore diameter. The surface area was determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method, while the pore volume and average pore diameter by the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method. For characterization of meso- and macropores, the average pore diameter, porosity, apparent and bulk densities were determined by mercury intrusion porosimetry (Micromeritics, 9500 Autopore IV). The real density was measured by helium pycnometer (Quanta-chromium MPY-2). The samples were exposed to 20% relative humid (RH) atmosphere (saturated with lithium chloride) for 24 hours before physical analysis. All analysis was carried out at least twice.

Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of non-processed dressings and loaded/processed dressings were obtained by the JEOL equipment (model JSM-5310, Japan). The analysis was carried out at 5 kV, with different magnifications. The cross-section samples obtained by using nitrogen were coated with gold (~300 Å) under argon atmosphere.

Characterization of copaiba oil loaded into dressing samples

The amount of copaiba oil loaded into the dressing samples was measured gravimetrically by the released oil mass in hexane from processed dressings. Hexane was selected based on the copaiba oil and biopolymers solubility's. Assays were carried out at 37 °C

during 4 hours with solvent renewing each hour until total oil removal. Subsequently, the copaiba oil solutions were submitted to evaporation. As a control, non-processed samples were also immersed in hexane, in order to verify some extraction compounds or dissolution in this solvent. No physical and chemical changes were observed (data not shown). The analyses were performed in duplicate. The impregnation % (loading yield) values were calculated considering the ratio between the initial copaiba oil placed into the cell and the remaining amount into the polymer multiplied by 100 %. Normalized values of oil mass into mass of polymer were also presented (mg/mg) for comparison purposes.

Gas chromatography analysis was carried out for the original and released copaiba oil. Samples were dissolved in ethyl acetate to obtain concentration of 5 mg/ml. The GC analysis were performed using a gas chromatograph (GC-FID, Finnigan-Tremetrics, model 9001, USA) equipped with DB-5 capillary column (30 mm × 0.35 mm × 0.25 mm). The carrier gas was helium at flow rate of 1.7 ml/min. The temperature heating started with 30 °C hold for 5 min, then a raise from 30 to 300 °C at heating rate of 5 °C/min and maintained for 5 min; injector and detector temperature was 240°C. The volume injected was 5 µl with split ratio of 1:20. The β-caryophyllene was quantified by external standard. All samples were injected twice. Main compounds of copaiba oil were identified by GC-MS (7890 A, Agilent, USA) using the same referred above program through available databases of NIST and FFNSC 2 (Wiley).

The solubility measurement (kg/m^3) of copaiba oil in scCO_2 was estimated using experimental data literature [16], calculating the ratio of the extract mass to the extraction process time ($\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$) per scCO_2 mass flow rate ($\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$). The Chrastil equation is used to correlate the solubility of a solid solute in a binary system, as a function of the solvent density and the absolute temperature. The parameters of this equation were obtained by a linear regression of the solubility data [34]. The partition coefficient was calculated by the average of copaiba oil mass loaded into the dressings (kg/kg) per the average copaiba oil mass solubilized in scCO_2 (kg/m^3), taking into account the cell volume used for SSI/SSD processing.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) and mean comparison tests (*t* student and Tukey tests) by ASSI/SSDSTAT software (2015), version 7.7 beta. All data obtained were represented as average ± standard deviation of measurements.

Results and Discussion

Copaiba oil loading into commercial wound dressings

The copaiba oil loading yield found for Promogran[®] samples varied from 0.53 to 1.46 %, while for Spongostan[®] varied from 0.54 to 2.07 % (Fig. 9A), corresponding to the initial values of oil mass of 100 and 200 mg, respectively. The range of 0.6 to 4.7 mg of loaded oil into dressing samples of 1 cm² could represent efficient dosages for some biological activities application when compared to literature. For example, an impregnation of *Copaifera multijuga* oil in paper showed activity against gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* with only 2 µg of loaded oil [24].

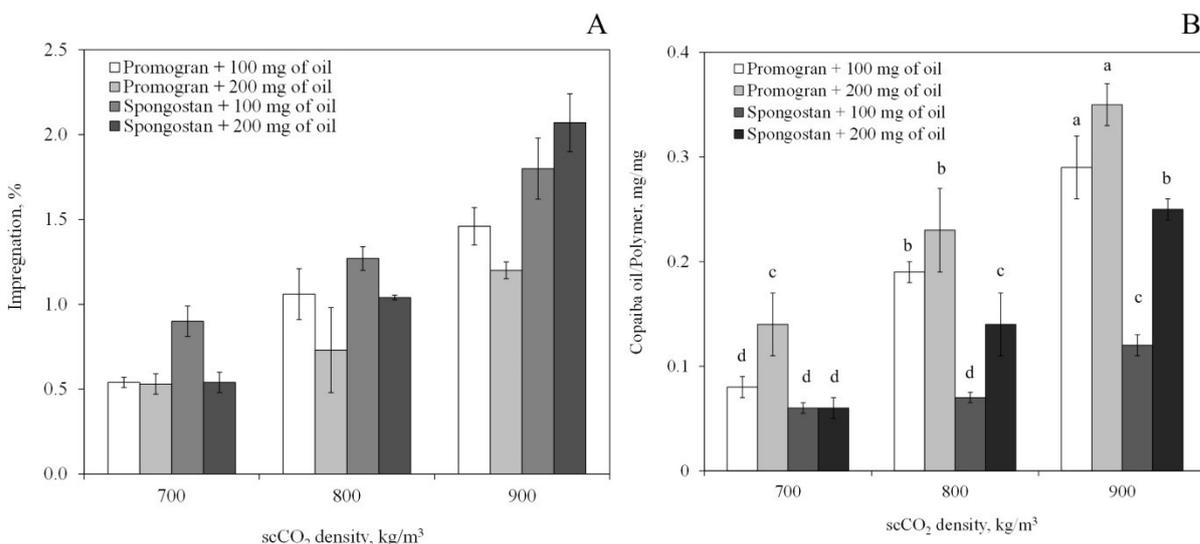


Figura 9. Copaiba oil loading into commercial wound dressings as a function of scCO₂ density: impregnation % (A); copaiba oil/polymer ratio (B). Same letters for each density indicate that there is no significant difference compared by the student t-test ($p < 0.01$)

Other authors evaluated the treatment of rats with oral dosages of 2000 mg/kg of *Copaifera langsdorffii* leaves extract, using LD₅₀ data. They suggest that the extract can be classified as a category 5 product, according to the toxicological classification scale provided by the Global Harmonized System, which median lethal dose it is recognized as a low acute toxic product [13].

The loaded copaiba oil yield values increased with the increase of scCO₂ density presenting a positive linear correlation (R^2 from 0.80 up to 0.98) for both dressings. The improvement in the range of 1.4-2.7 times for Promogran[®] was obtained when the system varied from 700 kg/m³ up to 900 kg/m³. For Spongostan[®] this increase was from 1.6 up to 3.8 times

(maximum impregnation value of 2%), showing that this system (Spongostan[®]/copaiba oil) was highly affected by pressure (Fig. 9A). These results indicate that at higher pressures the solubility of copaiba oil in scCO₂ increases (1st factor that affect the impregnation process) as well as the sorption of scCO₂ by the biopolymers (2nd factor that affect the impregnation process). The equilibrium sorption capacity is improved for some polymers with increase of scCO₂ density, as observed for P(MMA-EHA-EGDMA) and polyurethane based materials [38-39], and despite of few studies about scCO₂ sorption in the biopolymer, the general tendency is the polymer to swell at higher CO₂ densities.

Considering the third factor that could affect the impregnation yield, the oil/biopolymer affinity is also verified for Spongostan[®] (Fig. 9B), as this sample is a hydrophilic polymer (compared with Promogran[®]) the lower impregnation yield obtained with this biopolymer confirms the lower oil/Spongostan[®] affinity. A positive effect of copaiba oil solubility in scCO₂ seems to be the main factor that influences the impregnation yield for Spongostan[®], since the oils solubility is the same for both systems. In the case of Promogran[®] the oil/biopolymer affinity is promoted simultaneously with the high scCO₂ sorption of biopolymer supported by its hydrophobicity. The polymer/compounds affinity plays an important role on the interactions during SSI/SSD processing [30, 36, 40]. The mass ratio of loaded oil/polymer can confirm the affinity of biopolymer by the bioactive compounds, which presented higher values for Promogran[®] samples, compared to Spongostan[®] samples at the same conditions. These values indicated the hydrophobicity of Promogran[®], and confirm the affinity between biopolymer and copaiba oil, as well as biopolymer and scCO₂ (sorption effect) as predominant effects in this system. For Spongostan[®] system the affinity between biopolymer (gelatine) and scCO₂ is lower (higher hydrophilicity), and the oil solubility became the main factor that govern this system.

One more time, the difference between values of oil/polymer mass ratio when used initial mass of copaiba oil of 100 mg and 200 mg confirm that the oil solubility in scCO₂ affect the impregnation yield. This high difference for Spongostan[®] reinforce that the main factor that influence the impregnation yield is the oil solubility, because oil/polymer mass ratio increased twice with increasing of 100 to 200 mg of oil into the system. This happened at 800 and 900 kg/m³ with exception for 700 kg/m³, which is the condition where most of studied oils have lower solubility [41-42]. The difference for Promogran[®] is much lower, especially when considering the results standard deviation, being the impregnation is independent of initial mass of oil, while the scCO₂ sorption and oil/polymer affinity are the main effects on this system Promogran[®]/copaiba oil/scCO₂. The data variation was observed and it could be related to some

heterogeneity of the processed samples, which could be an indication that the process for biopolymers should be deeply studied considering the scCO₂ impregnation process. Despite of the estimative of copaiba oil solubility has been based on leaves extracts results [16], this consideration was taken into account because there are chemical similarities between copaiba oil (Tab. 1) and leaves extracts presented by literature [13, 14, 43].

The phytochemical study identified terpenic compounds commonly found on several species from *Copaifera* sp. genus, such as α -copaene, β -caryophyllene, α -cis-bergamotene, α -humulene, γ -muurolene, β -bisabolene, δ -cadinene, germacrene-B, and 9-epi-(E)-caryophyllene. These compounds are frequently found in the non-polar extract of leaves and oil resin of copaiba plants of main occurrence in the Brazilian regions of Amazonia, Midwest and Northeast [13, 14, 43]. The lack of standardization of copaiba oil have been faced with great challenge for its commercialization, it means, there is a high heterogeneity on the composition of secondary metabolites of copaiba, which can be related to edaphoclimatic conditions, natural genetic variations and plant injuries, etc. [43]. These variations of the oil composition can influence its pharmacological activity and toxicity [6]. Tab. 1 presents the identification of 38 peaks representing 98.55 % of the oil composition, which β -caryophyllene was found to be the major component (20.36 %) of the volatile fraction of copaiba oil. This compound has been identified as the main constituent of several species of copaiba plant investigated so far in leishmanicidal activity [2, 5] in addition to anti-inflammatory activity that has been frequently reported [5, 23, 43]. Other compounds with proved biological activities were found in the copaiba oil with relative area above 10 %, such as β -bisobolene, β -cadinene and α -copaene [44-46]. From these data, the partition coefficient (Fig. 10) and β -caryophyllene/polymer ratio (Fig. 11) were analysed in this work.

Tabela 1. Chemical profile of copaiba resin oil obtained by GC-MS

Retention Time (RT)	Compounds	Area, %
21.7	α -Cubebene	1.31
22.9	α -Copaene	11.51
23.5	β -Cubebene	1.82
24.7	β -Caryophyllene	20.36
25.4	α -cis-Bergamotene	7.98
25.8	Sesquisabinene	0.16
26.2	α -Humulene	2.97
26.5	Alloaromadendrene	1.74
27.2	γ -Muurolene	3.44
27.6	β -Selinene	4.44
27.9	α -Selinene	3.39
28.2	α -Muurolene	1.60
28.5	β -Bisabolene	13.85
28.7	γ -Cadinene	2.82
29.1	δ -Cadinene	12.46
29.5	Trans-Cadina-1,4-diene	0.97
29.7	α -Cadinene	0.41
29.9	(E)- α -Bisabolene	1.56
30.5	Germacrene B	0.28
30.9	Isodaucene	0.60
31.6	9-epi-(E)-Caryophyllene	1.27
32.7	Artemisia triene	0.14
33.0	Sibirene	1.32
33.8	Longicamphenylone	0.23
33.9	γ -Muurolene	0.68
34.2	Cadina-1(6),4-diene	0.51
34.5	Germacrene B	0.74
44.3	Manool	0.06
45.1	trans-, p-Mentha-2,8-dien-1-ol	0.06
45.4	allo-Aromandendrene epoxide	0.04
46.4	cis-Mayol	0.02
47.8	14-hydroxy-(Z)-Caryophyllene	0.05
48.2	Borneol	0.01
54.8	Myrtenyl isobutyrate	0.02
56.0	Longifolol	0.40
57.5	14-hydroxy-4,5-dihydro-Caryophyllene	0.07
59.8	4-methyl-Cyclohex-1-ene	0.20
66.1	trans-Mayol	0.07

Identified substances: ~98.55; % non-identified substances: ~1.45 %

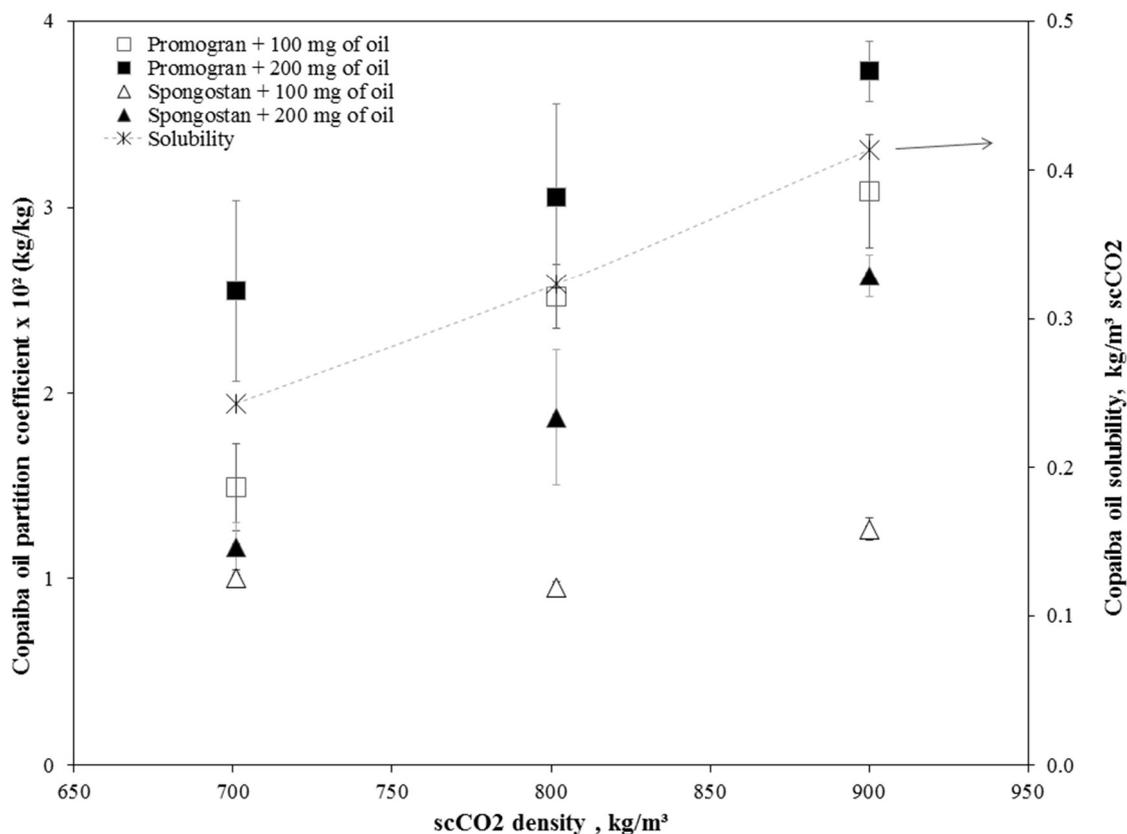


Figura 10. Partition coefficient of copaiba loaded into commercial wound dressings as function of scCO₂ density

Fig. 10 present the partition coefficient for both systems and confirm the higher affinity of oil by the Promogran[®] compared to Spongostan[®] dressings following the same tendency of copaiba oil solubility prediction.

Considering the β -caryophyllene as an important compound with leishmanicidal and anti-inflammatory activities [2, 5, 14, 19, 23], it was quantified in the released oil from polymeric dressings (Fig. 11). High β -caryophyllene/polymer values were found when both dressings were processed at 900 kg/m³, where the oil and the β -caryophyllene solubility in scCO₂ are higher [35]. The slight difference between loaded β -caryophyllene for Promogran[®] (up to 4.2 μ g/mg of polymer) and Spongostan[®] (3.6 μ g/mg of polymer) are probably related to nature of biopolymers as explained before. The calibration curve for beta karyophyllene is shown in Figure 33 (attachment).

The retention time of β -caryophyllene in this analysis was in average 22.9 min, and the chemical profile of released volatile compounds from commercial dressings is presented in Fig. 12. Similar chemical profile of copaiba oil were found for released oils from both commercial dressings when the initial copaiba oil mass was 200 mg (independently of scCO₂

density). Probably 100 mg of oil did not saturate the used scCO₂ volume reducing the amount of loaded copaiba oil into dressings, or the Promogran[®] have selective affinity for compounds with higher molecular mass in this process conditions.

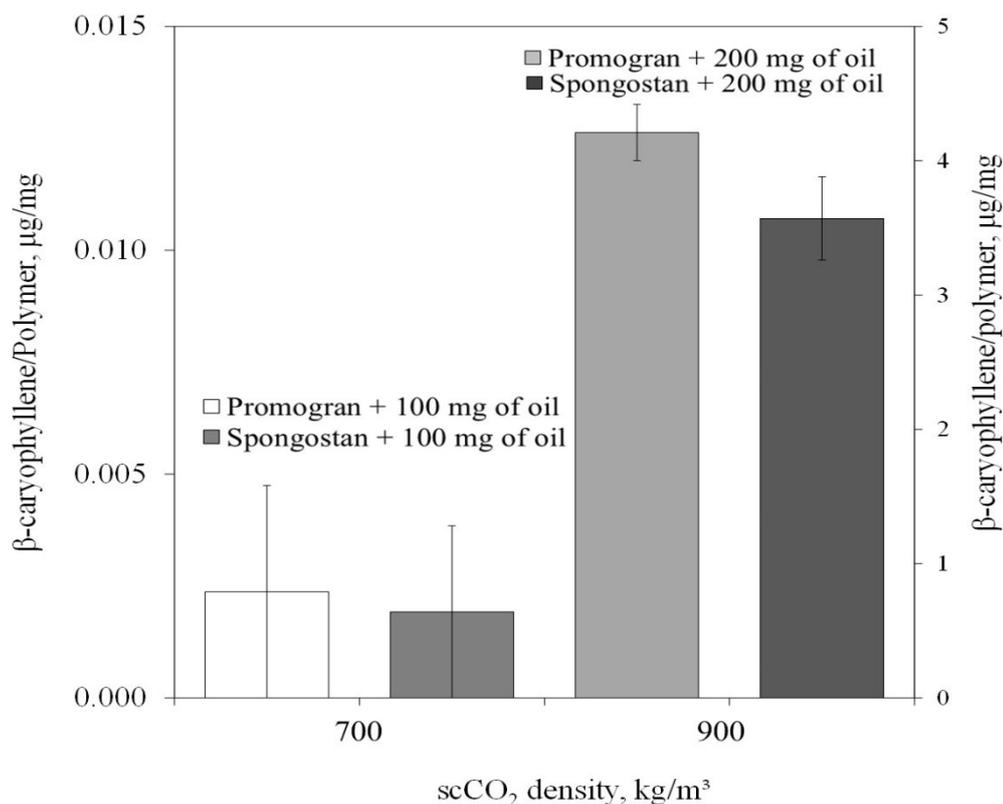


Figura 11. Quantification of released β-Caryophyllene from processed commercial wound

On biopolymers cross-section surfaces was found copaiba oil observed by SEM and presented in the supplementary material, Fig. 16. Similar surface roughness was obtained by Dias et al [32] and confirms oil deposition on cross-sections of the commercial dressings (inside the polymer).

Physicochemical characterization of the samples

The spectroscopy analysis (Fig. 13) performed for copaiba oil and for non-processed and processed commercial wound dressings confirmed the presence of aliphatic structures, such as sesquiterpenes (β-cariophyllene, β-bisobolene, β-cadinene, α-copaene) in the loaded biopolymers, evidencing different affinities of oil components with the dressings. This confirmation is established by the presence of (i) a strong bands between 2924 and 2867 cm⁻¹

[32, 47] on spectra obtained from the copaiba oil and the processed Promogran[®] samples and on 1446 and 1373 cm^{-1} [32], which are typical of stretching and bending vibrations from CH_2 and CH_3 groups, as well as, vibrations of aliphatic structures $(\text{CH}_2)_n > 4$; (ii) a strong band between 1684 and 1738 cm^{-1} , which corresponds to stretching vibrations of $\text{C}=\text{O}$ bonds from acids carbonyl [32, 47], only found on oil and processed Promogran[®] spectra, indicating the affinity of the oil components to the dressing material. The presence of the band at 3200 cm^{-1} indicates the $-\text{OH}$ group (typical from alcohols, carboxylic acids and phenols) or $-\text{NH}$ group (amides and amines), and the absence of stretching vibrations in wavenumber region, confirms the lipophilicity of the copaiba oil. While the non-processed and processed dressings presented large bands between 3200 and 3500 cm^{-1} indicates of strong peptidic $\text{N}-\text{H}$ stretching mode, and strong bands at 1235, 1539 and 1692 cm^{-1} confirmed amide I, amide II and amide III, respectively [48]. These data confirmed the presence of amines and amides from the structure of biopolymers that compose the commercial wound dressings, such as collagen/regenerated cellulose (Promogran[®]) and gelatine (Spongostan[®]) [32, 48, 49, 50].

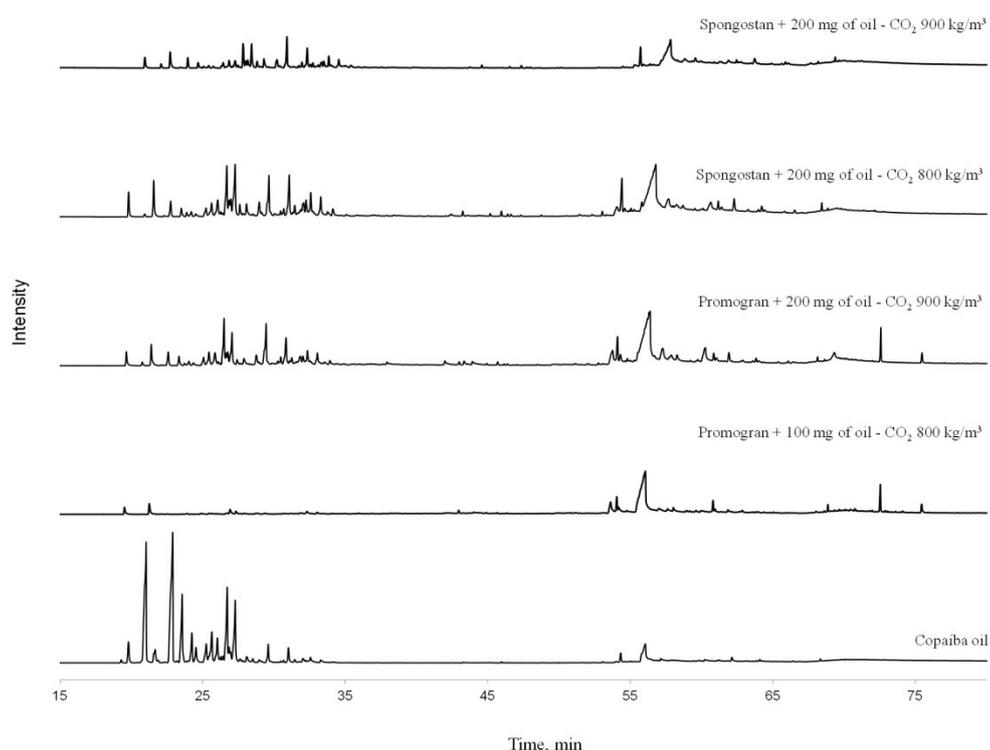


Figura 12. Chemical profile of loaded and released copaiba oils from commercial dressings

Band (cm ⁻¹)	Group	Samples	Reference
1373	CH ₂ ; CH ₃ ; (CH ₂) _n >4	Copaiba oil	[32]
1446	aliphatic structure	Processed Promogran [®]	
1229	amide I	Spongostan [®]	[48]
1538	amide II	Promogran [®]	
1629	amide III		
1684	C=O	Copaiba oil	[32]
1738	acid carbonyl	Promogran [®]	[47]
2867	CH ₂ ; CH ₃ ; (CH ₂) _n >4	Copaiba oil	[32]
2924	octahedral bonds	Promogran [®]	[47]
3200	-NH strong peptidic	Promogran [®]	[48-50]
3500		Spongostan [®]	

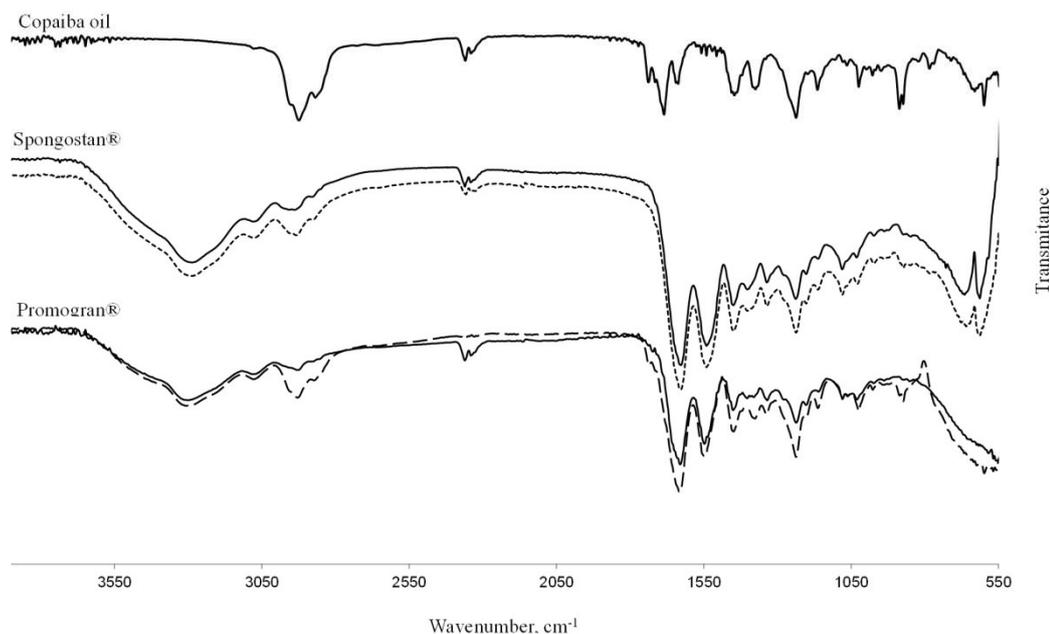


Figura 13. FTIR–ATR of the copaiba oil and dressing samples: non-loaded dressings (continuous line) and processed samples (dashed lines). Dressings were represented by Spongostan[®] and Promogran[®] processed at 800 kg/m³ and 900kg/m³ of scCO₂, respectively, both with initial mass of copaiba oil of 200 mg

The analysis of thermal stability showed that the commercial wound dressings lost weight in the beginning related to the sample humidity. Promogran[®] samples presented weight loss of ~3 %, while Spongostan[®] revealed a higher value of ~6 % (Fig. 17). These results are related to the difference between the biopolymers hydrophilicity, also verified in the assay of WVS capacity presented after in this work; however, both materials do not present any thermal event that could be associated to matter decomposition at the temperatures of 40 °C and 45 °C during 900 min of analysis. These results also indicate that during the process time of impregnation of selected dressings, the biopolymers composition will not be affected by the temperature.

The WVS capacity results are important to evaluate the control of water vapour and oxygen permeation by dressings on the process of wound healing. Considering that there are different types of wounds, such as dry, exudative among others, the WVS data assist to

understand if the dressing is suitable to treat the intended wound [27]. For example, highly exudative wounds it is recommended the use of hydrophilic dressings to promote water permeability avoiding bacterial proliferation, potential infection, and tissue injuries during healing process [51, 32].

The WVS capacity of Spongostan[®] was around 15 %, while that for Promogran[®] was around 11 % (Fig. 14), showing that the Spongostan[®] dressing material is more hydrophilic than Promogran[®]. This finding confirms that the Promogran[®] characteristic is responsible for the improved oil loading through oil and scCO₂ affinities, and the physico-chemical properties of systems can affect the sorption, swelling, impregnation phenomena that occur during SSI/SSD process [32, 52]. The Fig. 14 results showed water vapour sorption equilibrium after sixth hours of assay, in the case of both biomaterials. Those values were lower than films of N-Carboxybutylchitosan (CBC) and almost similar to agarose foam (AGA) described in the literature [31]. Despite of Promogran[®] having lower water vapour permeability ($\sim 3 \times 10^{-14}$, kg/smPa), when compared with synthetized CBC samples and the commercial Hyalofill[®] samples, its oxygen permeability was very high compared with those (~ 832 barrer) [32].

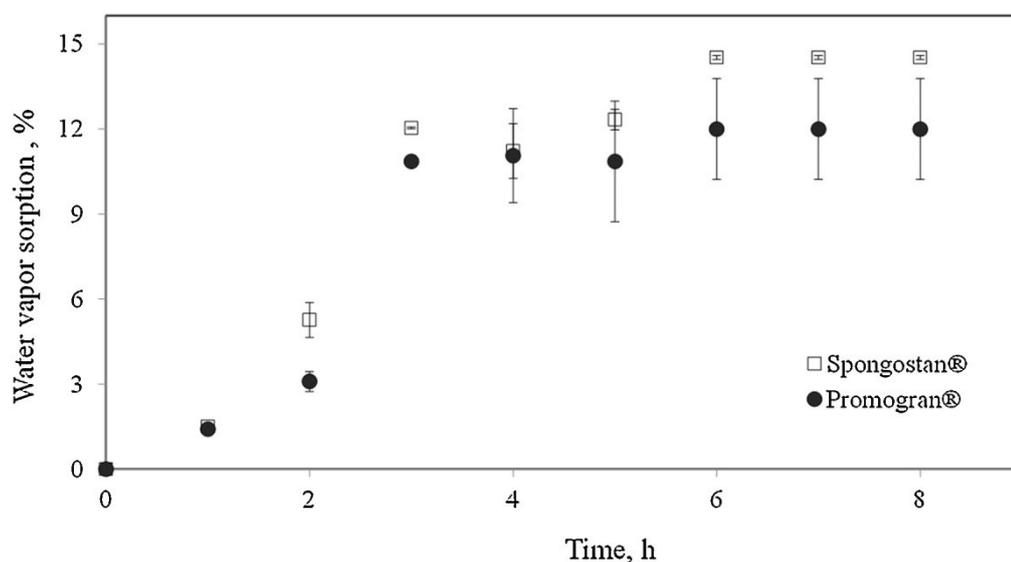


Figura 14. Equilibrium water vapor sorption values for Promogran[®] e Spongostan[®] dressings

For Promogran[®] samples it was observed high deviation values around average WVS, it has been hypothesized that the chemical composition of the dressing, based on collagen and regenerated cellulose, contains hydrophobic and hydrophilic domains that compete during water vapour sorption process.

Tabela 2. Thermal analyses of processed and of non-processed dressings and copaiba oil

Samples		scCO ₂ Density (kg/m ³)	Thermogravimetric analysis <i>Humidity (%)</i>	Calorimetric analysis		
				Event 1	Event 2	Event 3
				<i>T_{max} (°C)</i>		
Copaiba oil		-	-	-	159 ± 7	301 ± 12
Spongostan®	Non-processed	-	13 ± 1	48.8 ± 0.4	220.4 ± 0.5	301 ± 1
	Processed with 100 mg of oil	700	10 ± 3	76.9 ± 1.5	226.1 ± 1.4	299 ± 2
		800	10 ± 0.4	70.1 ± 1.9	223.8 ± 0.8	287 ± 2
		900	8.9 ± 0.5	73.9 ± 2.2	224.7 ± 0.2	289.0 ± 0.3
Processed with 200 mg of oil	900	10.6 ± 1.5	72 ± 1	224.1 ± 1.1	288 ± 3	
Promogran®	Non-processed	-	10.1 ± 0.9	80.5 ± 0.7	212 ± 3	304 ± 1
	Processed with 100 mg of oil	700	8.8 ± 0.4	76 ± 1	209 ± 1	299.2 ± 0.3
		800	8.5 ± 0.3	74 ± 1	205.1 ± 0.2	300.62 ± 0.01
		900	7.8 ± 0.1	81 ± 5	208 ± 2	299.5 ± 0.4
		Processed with 200 mg of oil	900	7.6 ± 0.2	76.2 ± 1.4	206 ± 3

Tabela 3. Physical properties of non-processed commercial wound dressings and processed by scCO₂

Samples	Pressure (bar)	scCO ₂ density (kg/m ³)*	Nitrogen adsorption			Mercury intrusion				Helium pycnometry
			Surface area (m ² .g ⁻¹)	Pore volume (cm ³ .g ⁻¹)x10 ²	Average pore diameter (Å)	Average pore diameter (µm)	Porosity (%)	Apparent density (g.cm ⁻³)x10 ²	Bulk density (g.cm ⁻³)x10 ²	Real density (g.cm ⁻³)
Promogran®	Non-processed		26.1 ± 2.7 ^{ab}	3.1 ± 0 ^c	48 ± 5 ^b	48 ± 2 ^b	91 ± 1 ^a	3.8 ± 0.1 ^{ab}	3.3 ± 0.4 ^{abc}	1.1 ± 0 ^{ab}
	132	701.01	26.9 ± 0.3 ^{ab}	11.3 ± 0 ^b	167 ± 2 ^a	35 ± 1 ^b	88 ± 3 ^{ab}	3.9 ± 0.5 ^{ab}	4.6 ± 0.4 ^a	1.1 ± 0.1 ^{ab}
	190	801.53	24.7 ± 2.3 ^{ab}	1.9 ± 0.2 ^d	31 ± 0 ^b	35 ± 0.2 ^b	84 ± 2 ^b	2.6 ± 0.1 ^{bc}	4.1 ± 0.3 ^{ab}	1.2 ± 0.1 ^a
	317	900.01	22.6 ± 2.0 ^b	1.8 ± 0.3 ^d	31.7 ± 2 ^b	29 ± 19 ^b	90 ± 2 ^{ab}	4.3 ± 0.3 ^a	4.2 ± 0.5 ^{ab}	0.9 ± 0 ^b
Spongostan®	Non-processed		29.8 ± 1.2 ^a	13.6 ± 0.3 ^a	183 ± 3 ^a	91 ± 5 ^a	88 ± 0 ^{ab}	2.0 ± 0.0 ^c	2.5 ± 0.0 ^c	1.1 ± 0.04 ^{ab}
	132	701.01	27.3 ± 5.0 ^{ab}	13.4 ± 0.6 ^a	199 ± 27 ^a	98 ± 2 ^a	90 ± 1 ^{ab}	3.5 ± 0.2 ^{ab}	3.7 ± 0.6 ^{abc}	1.04 ± 0.04 ^{ab}
	190	801.53	16.0 ± 1.9 ^c	0.8 ± 0.1 ^d	21 ± 0 ^b	100 ± 4 ^a	90 ± 2 ^a	2.9 ± 0.4 ^{bc}	2.8 ± 0.9 ^{bc}	1.1 ± 0.1 ^{ab}
	317	900.01	16.6 ± 0.1 ^c	1.1 ± 0.3 ^d	27 ± 7 ^b	99 ± 6 ^a	90 ± 1 ^{ab}	2.8 ± 0.5 ^{bc}	2.9 ± 0.4 ^{bc}	0.96 ± 0.02 ^{ab}

Letters equal in the same column indicate that no significant difference among the results of the *Tukey* test (p <0.05).

The thermal analyses were performed in order to evaluate possible alterations in the thermal stability of biomaterials, and the effect of SSI/SSD process on copaiba oil and samples. Biomaterials samples maintained in 20% relative humid atmosphere (saturated with lithium chloride) during 24 h before analysis adsorbed only ~10% of water vapour as indicated in Tab. 2.

The thermal analysis of pure copaiba oil showed two characteristic degradation events. The first event had the maximum temperature at 159 °C and the second at 301 °C (Tab. 2). These data are similar with those obtained for *Copaifera multijulga* oil differing slightly due to heterogeneity of natural oil [24].

All the dressing samples based on collagen/regenerated cellulose (Promogran[®]) and gelatine (Spongostan[®]) showed three thermal events. The first one, between 50 °C and 80 °C, can be attributed to the denaturation of collagen and gelatine [48, 53-54]. Further, it was observed that for non-processed Spongostan[®] dressing samples, the mass loss detected in the first event was higher than that for oil-loaded dressing samples. In this case, it was also identified an increase of the temperature of first thermal event for processed samples, that could be explained by thermal stability improvement provided by oil plasticizing effect on the biopolymer gelatine retarding the first event in around 20-25 °C. This can be considered a great improvement to use and process gelatine for biomedical applications.

The second and third events showed values that can be related to degradation and successive decomposition phenomena of biopolymers. For non-processed and processed Promogran[®] the second event presented values close to those found for cellulose fibers derived from different materials [55]. The second thermal event for non-processed and processed Spongostan[®], showed to be similar to those found for Promogran[®] and can be related to the degradation of peptide bonds that can be present on both dressing samples [48, 56]. In the third thermal event for both Promogran[®] and Spongostan[®] samples the maximum values obtained were close to 300 °C, which can be related to degradation and decomposition of peptide chains [55-56]. Considering the analysis error, the process did not affect the thermal stability of Promogran[®] biopolymers.

The dressings processed by SSI/SSD method without copaiba oil were tested about the effect of scCO₂ density on the physical properties of the biopolymers. The nitrogen adsorption data showed that Promogran[®] samples presented a slight difference among surface area results (Tab. 3). Despite of significant statistical difference for samples processed at 900 kg/m³, the analysis error indicates the similarities among data. On the contrary, for non-processed

Spongostan[®] and processed at 132 bar, high values of surface area were found significantly different of samples processed at 190 and 317 bar. These data correlate with those previously described in literature, in which the pores of foam structure tend to decrease in assays performed at higher pressures [57]. Moreover, this same profile was observed in surface areas on wound dressings of chitosan-alginate and chitosan-alginate-Pluronic F68 (2%) [59]. This phenomenon was observed on structural micropores mainly for Spongostan[®] samples, and it has been hypothesized that the solvent compressibility force on the outer surface of the biomaterials changes the morphology.

The pore volume and the average pore diameter had similar tendencies for both dressings (Tab. 3). The Promogran[®] samples processed under 132 bar when compared to non-processed Promogran[®] samples showed an increase on pore volume and diameter, while the samples processed under pressures higher than 140 bar showed decreases. For Spongostan[®] samples a similar phenomenon occurred, but at 132 bar samples were similar to the non-processed ones, and at 190 and 317 bar values decreased around 90 % on volume and diameter of pores. Probably, some microporous collapsed during the process without compromising the total porosity of samples. It was verified by the density's variation (apparent and bulk densities) for all process conditions compared to the samples references (non-processed samples).

For the results of mercury intrusion, all samples presented isotherms similar to type II (IUPAC) typical of macroporous structures, it means, pore diameter larger than 50 nm [58] without accentuated hysteresis, which can be related to the presence of large and flat pores. Concerning to porosity, both wound dressings showed a range of 84 – 91 % similar with described by Dias et al. (2013) [32], without influence of pressure on this property. Similar to the porosity, the real density of both samples showed no important changes, which can be explained by the process did not change enough the polymeric chains in order to modify the polymers structures and their macroporosity.

Promogran[®] and Spongostan[®] dressings loaded with copaiba oil and the non-processed dressings, were fractured with nitrogen and observed by SEM (Fig. 15). The non-processed Promogran[®] samples showed a structure composed of flexible foam-like layers, which correlates with the result obtained by Dias et al. (2013) [32].

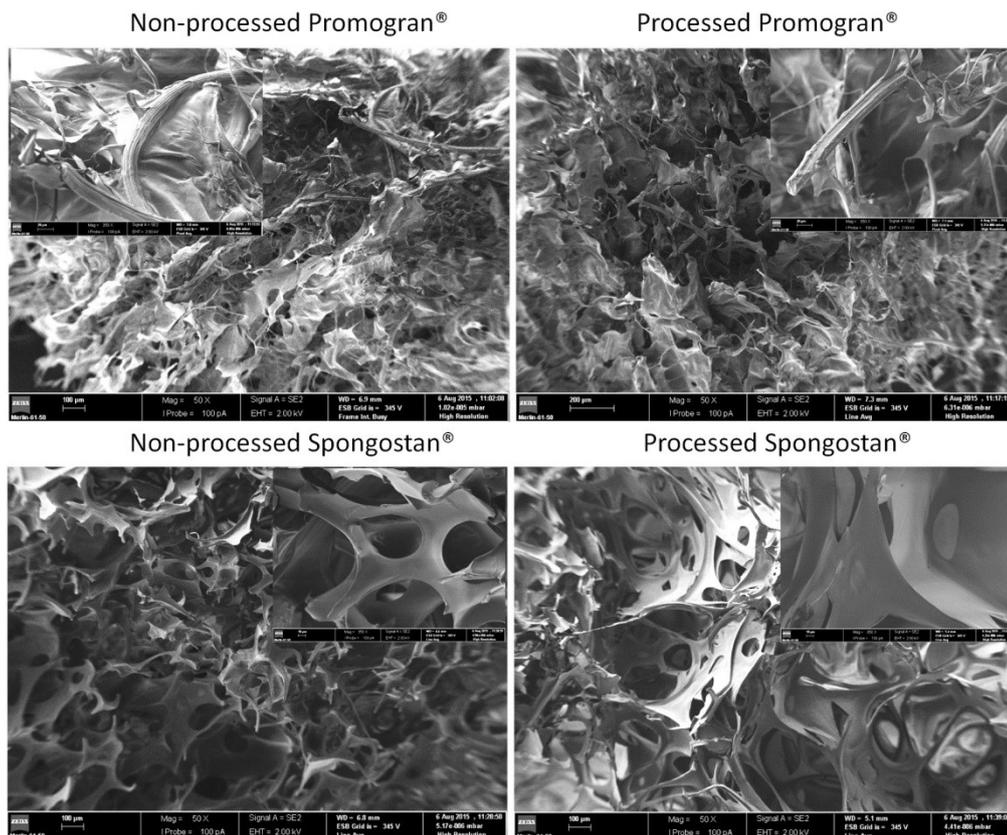


Figura 15. SEM micrographs for non-processed and processed commercial dressings processed at 900 kg/m³ using 200 mg of copaiba oil

Fiber-like structures were also found in Promogran® samples and this structure was kept even after SSI/SSD processing (Fig. 15). The foam-like structure was also found for Spongostan® and was kept after processing. The SEM analysis of oil-loaded dressing samples indicates that the oil was loaded on the surface of dressing biopolymeric structure of both Promogran® and Spongostan® (Fig. 16); however, the presence of oil loaded in the wound dressings detected by SEM, did not permit to reach any conclusion in regards to the homogeneity distribution the oil into dressings surface or the depth of penetration into polymeric matrices.

Conclusions

The SSI/SSD method used to load copaiba oil into commercial wound dressings is tuneable to control the copaiba oil loading of those biopolymeric materials. The SSI/SSD process provided a range of 0.06 - 4.7 mg of copaiba oil per mg of polymer (Promogran® and Spongostan®), which permitted to identify a variety of copaiba oil concentrations that can be performed by this method for these commercial dressings. The β -caryophyllene, main active

compounds of copaiba oil (leishmanicidal and anti-inflammatory activities), was successfully loaded into the polymeric matrices, as confirmed by GC analysis. In general, the physical structure of samples remained stable after processing with exception of the reduced surface area of Spongostan[®] at high pressure conditions, but improved thermal stability promoted by the copaiba oil plasticizing effect during the process. For the Spongostan[®]/copaiba oil/scCO₂ system the main factor that affect the impregnation process is the copaiba oil solubility in scCO₂, and for Promogran[®]/copaiba oil/scCO₂ system, the main factors seem to be the polymer affinity with copaiba oil and with scCO₂ simultaneously. The copaiba oil-loading process in commercial wound dressings using scCO₂ showed it can be promising, thus, further analysis on leishmaniasis wound using the copaiba oil loaded into dressings will be carried out.

Acknowledgements

This work was supported by PEst-C/EQB/UI0102/2013 (Portugal) and FCT/CAPES (Portugal-Brazil, FCT/2650/12/3/2013/S). D.R.C. Pascoal acknowledge the CAPES PhD scholarship, and M.E.M. Braga acknowledge FCT-MCTES for the program FCT Ciência 2008 and for the fellowship SFRH/BPD/101048/2014. Authors also acknowledge the Ferrosan Medical Devices (Denmark) for Spongostan[®] donation and Systagenix (USA) Promogran[®] donation.

Supplementary Material

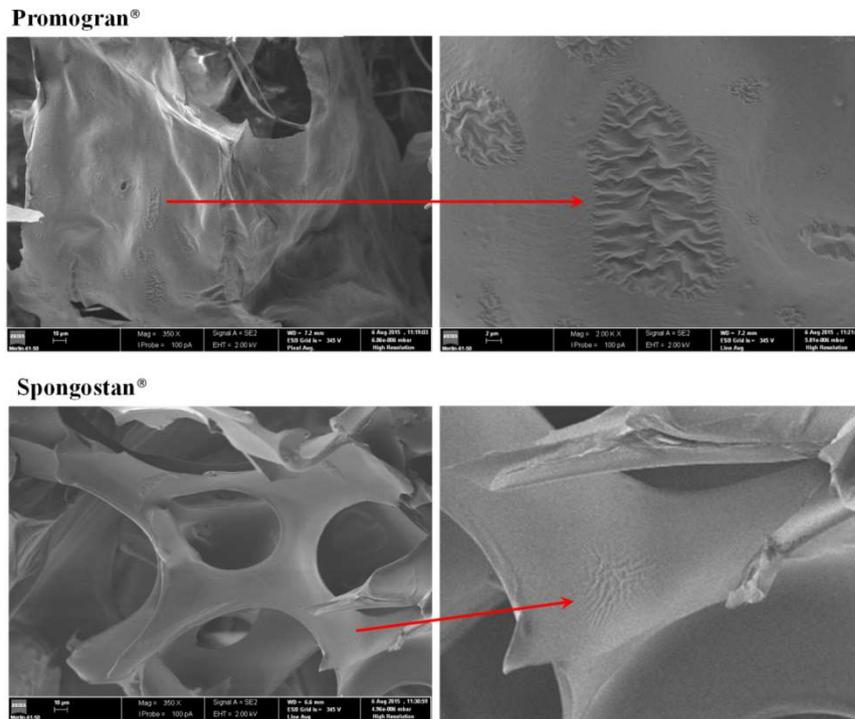


Figura 16. SEM micrographs details of commercial dressings processed at 317 bar and 45 °C, using 200 mg of copaiba oil.

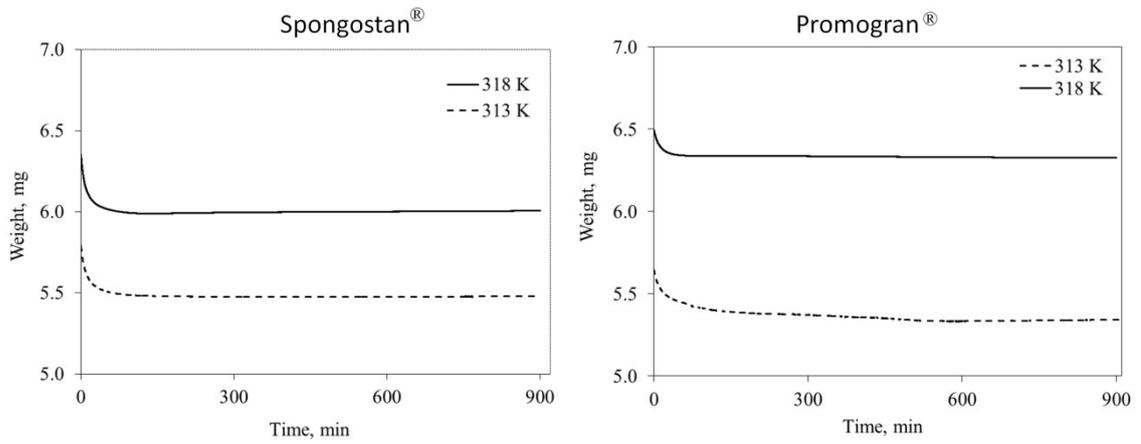


Figura 17. Thermal stability of commercial dressings measured at 40 and 45 °C

References

1. M.J. McConville, E. Handman. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology* 37 (2007) 1047–1051.
2. A.O. Santos, E. Izumi, T. U. Nakamura, B.P. Dias-Filho, V.F. Veiga-Junior, A.C. Pinto, C.V. Nakamura. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (2013) 59–64.
3. World Health Organization. Manual for case management of cutaneous *leishmaniasis* in the WHO Eastern Mediterranean Region (2014). Available from: http://applications.emro.who.int/dsaf/EMROPUB_2013_EN_1590.pdf.
4. C. Paris, P.M. Loiseau, C. Bories, J. Bréard. Miltefosine induces apoptosis like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (2004) 852–859.
5. D.C. Soares, N.A. Portella, M.F. Ramos, A.C. Siani, E.M. Saraiva. Trans- β -caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera ssp.*). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* (2013) 1-13.
6. S.C. Lima, V. Rodrigues, J. Garrido, F. Borges, P.K.T. Lin, A.C. Silva. In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against *Leishmania infantum* protozoa. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39 (2012) 424–430.
7. K.M. Bacon, P.J. Hotez, S.D. Kructen, S. Kamhawi, M.E. Bottazzi, J.G. Valenzuela, B.Y. Lee. The potential economic value of a cutaneous *leishmaniasis* vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine* 31 (2013) 480–486.
8. L.G. Rocha, J.R.G.S. Almeida, R.O. Macêdo, J.M. Barbosa-Filho. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12 (2005) 514–535.
9. F.G. Braga, M.L.M. Bouzada, R.L. Fabri, M.O. Matos, F.O. Moreira, E. Scio, E.S. Coimbra. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 111 (2007) 396–402.
10. B.B. Mishra, R.R. Kale, R.K. Singh, V.K. Tiwari. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 80 (2009) 81–90.
11. N. Singh, B.B. Mishra, S. Bajpai, R.K. Singh, V.K. Tiwari. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22 (2014) 18–45.
12. M. Bahmani, K. Saki, B. Ezatpour, S. Shahsavari, Z. Eftekhari, M. Jelodari, M. Rafieian-Kopaei, R. Sepahvand. Leishmaniasis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5 (2015) 695–701.
13. M. Lemos, J.R. Santin, C.S. Mizuno, T. Boeing, J.P.B. Sousa, D. Nanayakkara, J.K. Bastos, S.F. Andrade. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25 (2015) 238-245.
14. K.B. Santiago, B.J. Conti, B.F.M.T. Andrade, J.J.M. Silva, H.L.G. Rogez, E.J. Crevelin, A.B. Moraes, R. Veneziani, S.R. Ambrósio, J.K. Bastos, J.M. Sforcin. Immunomodulatory action of *Copaifera ssp* oleoresins on cytokine production by human monocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 70 (2015) 12–18.
15. A.G. Batista, A.S. Ferrari, D.C. Cunha, J.K. Silva, C.B.B. Cazarin, L.C. Correa, M.A. Prado, L.B. Carvalho-Silva, E.A. Esteves, M.R. Maróstica Junior. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chemistry* 197 (2016) 1153–1159.
16. J.R.S. Botelho, A.G. Santos, M.E. Araújo, M.E.M. Braga, W.G. Leal, R.N.C. Junior, M.A.A. Meireles. Copaiba (*Copaifera sp.*) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction:

- Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. *The Journal of Supercritical Fluids* 98 (2015) 167–171.
17. A.R.M. Costa, L.A.P. Freitas, J. Mendiola, E. Ibanez. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. *The Journal of Supercritical Fluids* 100 (2015) 86–96.
 18. M.S. Nogueira, R.A. Furtado, J.K. Bastos. Flavonoids and methoxy-galloylquinic acid derivatives from the leaf extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. *Journal Agriculture Food Chemistry* 63 (2015) 6939–6945.
 19. L.G. Lucca, S.P. Matos, B.T. Borille, D.O. Dias, H.F. Texeira, V.F. Veiga Junior, R.P. Limberger, L.S. Koester. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 104 (2015) 144–148.
 20. A.A.B. Silva, J.K. Bastos, A.R.F. Brunharoto. Method for preparing matrix micro-particles of *Copaifera langsdorffii* (aerial parts) and for isolating the active principles therein. WO2011120118 (A1), 2010.
 21. L.A.F. Paiva, K.M.A. Cunha, F.A. Santos, N.V. Gramosa, E.R. Silveira, V.S.N. Rao. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research* 16 (2002) 737–739.
 22. L.R.M. Estevão, J.P. Medeiros, L. Baratella-Evêncio, R.S. Simões, F.S. Mendonça, J. Evêncio-Neto. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 28 12 (2013) 863 – 869.
 23. V.F. Veiga-Junior, E.C. Rosas, M.V. Carvalho, M.G.M.O. Henriques, A.C. Pinto. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* 112 (2007) 248–254.
 24. C.L. Morelli, M. Mahrous, M.N. Belgacem, M.C. Branciforti, R.E.S. Bretas, J. Bras. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. *Industrial Crops and Products* 70 (2015) 134–141.
 25. S.R.M. Lima, V.F. Veiga-Junior, H. Christo, A.C. Pinto, P.D. Fernandes. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research* 17 (2003) 1048–1053.
 26. H. Wagner, K.H. Kostka, C.M. Lehr, U.F. Schaefer. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal Controlled Release* 75 (2001) 283–295.
 27. T.N. Yudanova, I.V. Reshetov. Drug synthesis methods and manufacturing technology modern wound dressings: manufacturing and properties. *Journal Pharmaceutical Chemical* 40 (2006) 85–92.
 28. D. Altioik, E. Altioik, F. Tihminlioglu. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 2227–2236.
 29. I. Kikic, F. Vecchione. Supercritical impregnation of polymers. *Current opinion in Solid State and Material Science* 7 (2003) 399-405.
 30. M.E.M. Braga, M.T.V.P. Pato, H.S.R. Costa Silva, E.I. Ferreira, M.H. Gil, C.M.M. Duarte, H.C. Sousa. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *The Journal of Supercritical Fluids* 44 (2008) 245–257.

31. 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. *International Journal of Pharmaceutics* 408 (2011) 9–19.
32. 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 jucat (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *The Journal of Supercritical Fluids* 74 (2013) 34–45.
33. M. Maschietti. High-pressure gas–liquid equilibrium of the system carbon dioxide–Caryophyllene at 50 and 70 °C. *Journal of Supercritical Fluids* 59 (2011) 8–13.
34. A.B.S. Rosa, S. Marceneiro, M.E.M. Braga, A.M.A. Dias, H.C.S. Sousa. Solubility of all-*trans* retinoic acid in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 98 (2015) 70–78.
35. E.M.Z. Michielin, S.R. Rosso, E. Franceschi, G.R. Borges, M.L. Corazza, J.V. Oliveira, S.R.S. Ferreira. High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and *trans*-caryophyllene. *Journal Chemical Thermodynamics* 41 (2009) 130–137.
36. M.E.M. Braga, M.B.C. Matos, A.M.A. Dias, H.C. Sousa. Desenvolvimento de aplicações farmacêuticas e biomédicas através de métodos de impregnação/deposição com fluido supercrítico, *in* Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados. H.C. Sousa, M.E.M. Braga, A. Sosnik, (Eds), Universidade de Coimbra, 2015, p. 309-383.
37. C.V. da Silva, V.J. Pereira, P.T.V. Rosa, 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 into a polyurethane-based wound dressing. *The Journal of Supercritical Fluids* 115 (2016) 1–9.
38. A.R.C. Duarte, C. Martins, P. Coimbra, M.H.M. Gil, H.C. de Sousa, C.M.M. Duarte. Sorption and diffusion of dense carbon dioxide in a biocompatible polymer. *The Journal of Supercritical Fluids* 38 (2006) 392–398.
39. 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 into a polyurethane-based wound dressing. *The Journal of Supercritical Fluids* 115 (2016) 1–9.
40. V.P. Costa, M.E.M. Braga, J.P. Guerra, A.R.C. Duarte, C.M.M. Duarte, E.O.B. Leite, H.M. Gil, H.C. Sousa. Development of therapeutic contact lenses using supercritical solvent impregnation method. *The Journal of Supercritical Fluids* 52 (2010) 306-316.
41. J. M. Danlami, M. A. A. Zaini, A. Arsad, M.A.C. Yunus. Solubility assessment of castor (*Ricinus communis* L) oil in supercritical CO₂ at different temperatures and pressures under dynamic conditions. *Industrial Crops and Products* 76 (2015) 34–40.
42. K. S. Duba, L. Fiori. Solubility of grape seed oil in supercritical CO₂: Experiments and modelling. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 100 (2016) 44–52.
43. P.C.S. Barbosa, L.S.M. Wiedemann, R.S. Medeiros, P.T.B. Sampaio, G. Vieira, V.F. Veiga-Junior. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chemistry & Biodiversity* 10 (2013) 1350–1360.
44. Y.J. Jou, C.H. Hua, C.S. Lin, C.Y. Wang, L. Wan, Y.J. Lin, S.H. Huang, C.W. Lin. Anticancer Activity of γ -Bisabolene in Human Neuroblastoma Cells via Induction of p53-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Molecules* 21 (2016) 601.
45. A.Kundu, S. Saha, S. Walia, N.A. Shakil, J. Kumar, K. Annapurna. Cadinene sesquiterpenes from *Eupatorium adenophorum* and their antifungal activity. *J Environ Sci Health B*. 48 (2013) 516-522.

46. H. Turkez, B. Togar, A. Tatar, F. Geyikoglu, A. Hacimuftuoglu. Cytotoxic and cytogenetic effects of α -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia* 69/7 (2014) 936–942.
47. V.R.A. Borges, J.H. Silva, S.S. Barbosa, L.E. Nasciutti, L.M. Cabral, V.P. Sousa. Development and pharmacological evaluation of in vitro nanocarriers composed of lamellar silicates containing copaiba oil-resin for treatment of endometriosis. *Materials Science and Engineering C* 64 (2016) 310–317.
48. I.S. Raja, N.N. Fathima. A gelatine based antioxidant enriched biomaterial by grafting and saturation: Towards sustained drug delivery from antioxidant matrix. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128 (2015) 537–543.
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, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. Submitted to *Analytical Chemistry*, 2016.
50. K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, C. Petibois. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 395 (2009) 829–837.
51. Ovington, L.G. Advances in wound dressings. *Clin. Dermatol.* 25 (2007) 33–38.
52. F. Yañez, L. Martikainen, M.E.M. Braga, C. A. Lorenzo, A. Concheiro, C.M.M. Duarte, M.H. Gil, H.C. Sousa. Supercritical fluid-assisted preparation of imprinted contact lenses for drug delivery. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 1019–1030.
53. W. Liu, Z. Tian, C. Li, G. Li. Thermal denaturation of fish collagen in solution: A calorimetric and kinetic analysis. *Thermochimica Acta* 581 (2014) 32–40.
54. 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 and Pigments* 116 (2015) 65–73.
55. J. Chen, J. Xu, K. Wang, X. Cao, R. Sun. Cellulose acetate fibers prepared from different raw materials with rapid synthesis method. *Carbohydrate Polymers* 137 (2016) 685–692.
56. D.M. Correia, J. Padrão, L.R. Rodrigues, F. Dourado, S. Lanceros-Méndez, V. Sencadas. Thermal and hydrolytic degradation of electrospun fish gelatine membranes. *Polymer Testing* 32 (2013) 995–1000.
57. Q. Xu, X. Ren, Y. Chang, J. Wang, L. Yu, K. Dean. Generation of microcellular biodegradable polycaprolactone foams in supercritical carbon dioxide. *Journal of Applied Polymer Science* 94 (2004) 593–597.
58. IUPAC. Physical Chemistry Division Commission on Colloid and Surface Chemistry. Subcommittee on Characterization of Porous Solids. *Pure & Appl. Chem.*, 66 (1994) 1739–1758.
59. C.Z. Bueno, A.M. Moraes, H.C. Sousa, M.E.M. Braga. Effects of supercritical carbon dioxide processing on the properties of chitosan–alginate membranes. *The Journal of Supercritical Fluids* 112 (2016) 128–135.

Bioactives Compounds of *Copaifera sp.* Impregnated into Three-Dimensional Gelatin Dressings

Diego R.C. Pascoal^a, Eudes S. Velozo^b, Mara E.M. Braga^c, Herminio C. Sousa^c,
Elaine C.M. Cabral-Albuquerque^a, Silvio A.B. Vieira de Melo^{a,d,*}

^a*Programa de Engenharia Industrial, Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Rua Aristides Novis, 2, 6º andar, Federação, 40210-630, Salvador, Bahia, Brasil*

^b*Departamento de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, 40170-115, Salvador, Bahia, Brasil*

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

^d*Centro Interdisciplinar em Energia e Ambiente, Campus Universitário da Federação/Ondina, Universidade Federal da Bahia, 40170-115, Salvador, Bahia, Brasil.*

* sabvm@ufba.br

Abstract

This study investigates the immersion impregnation process of the copaiba oleoresin and leaf extract into SpongostanTM gelatin dressings to be used in wound healing treatment. Copaiba oleoresin and leaf extract were characterized by spectroscopic analyses in order to confirm the identity of bioactive compounds and their compatibility with dressing material. Their antibacterial properties were evaluated and oleoresin activity against *E. coli* and *S. aureus* bacteria was confirmed while the leaf extract showed activity against *S. aureus*. Solubility assays in organic solvents revealed that copaiba oleoresin is miscible into dichloromethane, while leaf extract showed a 20 g/ml solubility coefficient at 35 °C in the same solvent. These miscibility and solubility conditions were selected for the impregnation process. Using the organic solvent immersion method, 11 mg of copaiba oleoresin and 19 mg of leaf extract was impregnated into 1 cm³ of 3D matrix. The main bioactives from copaiba products, such as β -caryophyllene and lupeol, were tracked in the gelatin dressing. DSC and TGA assays showed no thermal changes in the samples after impregnation. Furthermore, the spatial organization of foam structure of the dressings was preserved after superficially distribution of oleoresin, as well as amorphous-like particulate deposition of leaf extract. The main compound of copaiba oleoresin, β -caryophyllene, which exhibits well-known anti-inflammatory activities, and the main compound of copaiba leaf extract, lupeol, also an anti-inflammatory agent, were successfully impregnated using organic solvent in wound dressings, and are promising for further application on tissue wound healing.

Keywords: Impregnation; 3D matrix; terpene; *Copaifera sp.*, copaiba; leaf extract; oleoresin.

Introduction

Tissue regeneration methods have been gaining a considerable amount of attention in pharmaceutical and biomedical research fields, including the treatment of arthroplasty infections, soft-tissue infections, prosthesis-related infections, and open fractures [1, 2]. In this scenario, technology applied to biomaterial-based devices has advanced, pursuing the effective improvement of spatial organization, mechanical resilience, structure integrity, and biochemical activity of damaged tissue [3, 4].

Protein-based biomaterials are one of the most used options in tissue regeneration research [5 – 7]. The protein structure has physical-biochemical properties that favour the formation of an extracellular matrix support along with the recruitment of adhesion cells, important for the cellular response required for native tissue regeneration [8–10]. The surface stiffness and extensional elasticity of engineered biomaterials can be developed to guide the regenerative cell response [4, 5].

Gelatin-based three-dimension matrices (3D) have advantageous characteristics as a promising biomaterial for enhancement of mechanical properties and swelling of the extracellular matrix [5, 7,11]. There are several protein-based matrices on the market for this purpose, such as Surgifoam™ (Ethicon, USA), Gelfoam™ (Pfizer, USA), Hemospon® (Maquira, Brazil), Lyostyp® (Braun, Germany). Klangjorhor et al. [10] in an autologous chondrocyte implantation study found that Spongostan™ (Ferrosan, Denmark), a gelatin 3D scaffold, provided higher values of wet weight increment in comparison to a collagen scaffold. The authors considered the wet weight as a parameter to assess extracellular matrix production.

Gelatin is derived from denatured collagen retaining the arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD) motif peptide for cell adhesion and penetration. Moreover, the scaffold gelatin Spongostan™ is a promising promoter of chondrocyte expansion thorough a chondrogenic phenotype retention at mRNA levels. Also, the 3D structure of Spongostan™ favours the formation of an extracellular matrix and adaptation to the autologous in 3D culture [5, 10].

The incorporation of bioactive compounds into biomaterials has been done in order to avoid foreign-body infections caused by bacterial monolayer (bacterial biofilms) commonly developed for tissue surface [5, 10, 12] The biomaterials engineering research field is crucial for improving the incorporation of bioactives within their therapeutic window range, preserving their antimicrobial activity without reaching allergenic levels [6, 13, 14]. There has been increasingly interest in bioactive-incorporated biomaterials as an alternative for tissue

regeneration treatment [14]. Among Brazilian natural products, copaiba has been investigated as an interesting option for medical application [15–18].

Copaiba (*tupy cupa-yba*) is a Brazilian native tree from *Copaifera sp. genus* and *Leguminosae* botanical family. The therapeutic effects of copaiba oleoresin, produced in the tree trunk, have been previously described in the literature [16]. In 1972, copaiba oleoresin was approved as a herbal medicine by the Food Drug Administration (FDA) and it has more than 30 ethnopharmacological indications described in the literature [16 – 18], because of its recognized antibacterial activity [17, 19 – 21]. The aerial parts of *Copaifera sp.* are mostly exploited for their pharmacological activity, leading to their application in the treatment of various conditions, such as renal lithiasis, arthritis, tartar, muscle and spasmodic pains in general, inflammation, and urinary tract infections [19–25]. Copaiba oleoresin in its natural form is known to induce pro-inflammatory synthesis of growth factors, such as TGF- α , an important synthesis stimulator of extracellular matrix. When copaiba oleoresin is used in its natural form for wound healing, it was shown to cause deleterious effects in damaged tissues regeneration, particularly on the reepithelization step [26]. Advances in research into the impregnation of copaiba bioactive compounds in extracellular matrices for drug delivery can be a way to solve this problem and enhances the healing action of these copaiba bioactive compounds.

Considering this direct effect of copaiba oleoresin on tissue regeneration, the loading of compounds with anti-inflammatory, wound healing and antibacterial activities, such as those found in copaiba oleoresin, into biopolymeric matrices can be highly advantageous for supporting the tissue healing process [9,27,28]. The indirect contact can be done by polymeric supporting with reduced concentrations of those bioactive compounds. The reduction of bioburden in injured tissue has been previously shown to accelerate the wound healing process *in vivo* [29]. Furthermore, the incorporation of herbal hydrophobic medicinal oils into biopolymeric matrices was shown to not change the organizational architecture of the biomaterial, preserving its biofunction [1, 6, 7]. This research group has previously studied the impregnation of copaiba oleoresin in a 3D biopolymer matrix by a dense CO₂-assisted method, using higher pressure in range from 132 to 317 bar at 45 °C [30].

The present study investigates the impregnation process of the copaiba bioactives compounds from oleoresin and leaf extract, into a commercial biodegradable gelatin 3D dressing by organic solvent immersion method for tissue repair treatment.

Material and methods

Material

Hexane (HXN) was provided by Qhemis[®] (São Paulo, Brazil) and dichloromethane (DCM) by Fmaia[®] (Belo Horizonte, Brazil). The commercial dressings Spongostan[™] (Ferrosan, Denmark) were kindly donated by the manufacturer. The aerial parts of *Copaifera luetzelburgii* were collected in Barreira, Bahia, Brazil (lat: -10.16667, long: -44.86667 WGS84). The voucher specimen was identified by Dr. Jorge A.S.C., and deposited at the Herbarium of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), with the registration code CEN21705. The leaves were cleaned and stabilized by drying at room temperature, then triturated by a mill (Thomas Wiley Laboratory, model 4) and stored in a clean, dry place. Copaiba oleoresin was collected by extractivism in the city of Cuiabá, obtained from a tree trunk using an auger, then stored in polypropylene container. This oleoresin was donated by the Laboratory of Medical Material Research (LAPEMM) at the Federal University of Bahia (UFBA).

Extraction procedure of compounds *Copaifera luetzelburgii* leaves

The *C. luetzelburgii* leaves (300 g) were macerated in HX (6 L) for 7 days. Then filtration and concentration under reduced pressure were carried out using rotary evaporator (model RV 10 Basic) at 40 °C. The macerated process was performed successively 3 times [31,32].

Antibacterial assays

Biological tests evaluated the activity of copaiba leaf extract and oleoresin against strains of the American Type Culture Collection (ATCC), of the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). The test solutions were prepared with 100 mg of copaiba leaf extract and oleoresin, dissolved into 1 mL dimethylsulfoxide (DMSO). The antimicrobial activity was evaluated by disk-diffusion agar method with 6 mm diameter paper filter disks. The disks were impregnated with aliquots of 5 µL of the test solution, with an amount of 4 mg of copaiba leaf extract or oleoresin to Gram-positive bacterium and 8 mg to Gram-negative bacteria. Between applications, the disks were dried at 45 °C for 5 minutes.

The amount of copaiba leaf extract or oleoresin used in the impregnated disks was based in that found in the literature [15,33]. Microbial suspensions were prepared by placing colony forming units (CFU) in 5 mL of sterile saline solution (0.9% NaCl), where the bacterial suspensions were standardized according to the McFarland scale (0.5). The solutions were then inoculated on a Petri plate containing Mueller-Hinton agar using a sterile swab. After inoculation, the disks were then picked up with forceps and the plates were incubated under aerobic conditions at 37 °C for 24 h. The diameters (mm) of inhibition zones of microbial growth were measured. Disks inoculated with the organic solvents used in the extract solutions were used as negative controls. The 10 UI of penicillin antibiotic (PEN) and 5 µg ciprofloxacin (CIP) were used as positive controls for gram-positive and gram-negative bacteria, respectively. All the material was sterilized under UV light at 400 - 320 nm for 30 minutes [34,35].

Solubility of oleoresin and leaf extract in organic solvent

The solubility of oleoresin and leaf extract in HXN and DCM organic solvent was performed for SpongostanTM. This biomaterial was immersed in hermetic glass bottle with HXN and another with DCM, for 24 hours at 25 °C, followed by solvent evaporation and weighting of the obtained dry mass. The cloud point method was applied to study the solubility of the leaf extract and oil resin in organic solvents [36]. The samples were put in a hermetic system, in organic material (oil resin or extract leaf) for organic solvent (HXN or DCM) the mass range were of 10 to 90 %, followed by HXN and DCM mixing up to the solution saturation point (one phase), with heating at 35 °C. The homogeneous solutions were stored for 72 hours, to observe phase changes from the equilibrium condition. The cloud point was determined by changing from homogeneous liquid solution to heterogeneous biphasic mixture. The aspects of the samples were classified into transparent liquid (TL) and biphasic system (BS). Another solubility test was performed by the refractive index method. The samples of copaiba oleoresin were put in a hermetic system with different mass fractions (0 to 100 %) of copaiba oleoresin in HXN or DCM organic solvents. Then, they were sonicated in an ultrasonic bath (Ultronique, Brazil) for 5 minutes and their refractive indexes were measured at 25 °C (Quimis Abbe bench, Brazil) [37]. In order to analyse the solubility of the copaiba oleoresin in the organic solvents HXN and DCM, calibration curves of refractive index (η) versus oil mass fraction (x) were plotted.

Impregnation of biodegradable gelatin three-dimensional matrix with copaiba leaf extract or oleoresin

The copaiba leaf extract and oleoresin were incorporated into the biopolymeric matrix by immersion, according to an impregnation method previously described in the literature [15,38,39]. The initial preparation of the bioactive solution for impregnation was performed by taking into account solubility studies (methods described the previous section). Initially, 300 mg of sample (leaf extract or oleoresin) was placed at the bottom of the glass impregnation cell, and then supplemented with 15 mL of DCM. The system was hermetically sealed, heated at 35 °C and placed in an ultrasonic bath (Ultronique, Brazil) for 10 minutes. The Spongostan™ dressing samples (1 × 1 × 0.8 cm³) were immersed into the incorporation solution for 3 hours, at 35 °C, kept under stirring (700 rpm) under hermetically sealed conditions. The dressing samples were withdrawn from the incorporation solution and dried at 25 °C, under atmospheric pressure, during 72 hours for solvent removal.

Characterization of copaiba leaf extract and oleoresin

Physicochemical characterization of copaiba leaf extract and oleoresin

Initially, trials were carried out to identify the presence of alkaloids, polyphenols and polycyclic compounds such as steroids, poly-terpenoids and volatile compounds using Dragendorff, ferric chloride, Liebermann-Burchard reagents and anisaldehyde, which were analyzed by thin layer chromatography (TLC). The HXN/Ethyl acetate (8:2) solvents mixture was used as mobile phase, and silica gel 60F plates (Merck, Germany) were also used at UV wavelength (365 nm) [31].

Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analyses were performed with the copaiba leaf extract and oleoresin. The GC-MS analyses were carried out using a Shimadzu chromatography (QP-2010, Japan), equipped with EN5MS capillary column (30 mm × 0.25 mm × 0.25 mm) SGE Analytical Science, operated in the ionization mode (EI) 70 eV and the carrier gas helium was at a flow rate of 1.2 mL/min, for oil resin, and 1.3 mL/min, for leaf extract. The assays carried out for oil resin with a split ratio of 1:60, with heating temperature started at 60 °C, held for 5 min, raising from 60 to 240 °C at a heating rate of 3 °C/min,

maintained for 15 min; for leaf extract, with a split ratio of 1:10, the heating temperature started at 60 °C, held for 5 min, raising from 60 to 310 °C at a heating rate of 15 °C/min, maintained for 15 min. The injector and detector temperature was 250 °C, while the volume injected was 1 µl for all samples. All components were identified by comparing their GC retention data with Wiley7, FFNSC 1.3 and NIST08 libraries, as well as those cited in the literature. Terpene retention indices were calculated using n-alkane standard solutions (C8 – C20) available from Fluka S. A, in the same chromatographic conditions [40,41].

All Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra of copaiba oleoresin or leaf extract were acquired using a Bruker NMR spectrometer (AVANCE III HD, USA) under the following conditions: 500 MHz and 100 MHz for ^1H and ^{13}C and chloroform-D was used as a reference for the residual solvent signals. Copaiba bioactives (oleoresin and leaf extract) spectra were compared with spectra cited in the literature [42].

Characterization of copaiba oleoresin and leaf-extract impregnated on 3D matrix

The amount of copaiba mass (oleoresin and leaf extract) incorporated into 3D matrices was gravimetrically measured by the released oleoresin and leaf extract mass in HXN from processed dressings. HXN was selected based on the copaiba oleoresin, leaf extract and biopolymers solubility. All assays were carried out at 37 °C for 4 h with solvent renewing each hour until total oleoresin or leaf extract removal [7]. Subsequently, the copaiba oleoresin and leaf extract solutions were submitted to evaporation. As a control, non-processed samples were also immersed in HXN, in order to verify some extraction of compounds or dissolution in this solvent. The analyses were performed in triplicate. The yield impregnation (%) values were calculated considering the initial copaiba oleoresin (IOC) and leaf extract (ILE) placed in the cell and the remaining amount in the polymer. Normalized values of oleoresin and leaf extract mass per mass of polymer were also calculated (mg/mg) for comparison purposes and the partition coefficient of the samples was measured for the ratio of copaiba mass_(polymer) to copaiba mass_(solvent) $\times 100$.

Chemical group spectroscopic profiles were carried out by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) using Bruker equipment (Vertex 70, USA). The leaf extract was solubilized in chloroform and analysed by FTIR using sapphire windows. Non-processed

SpongostanTM and SpongostanTM processed by organic solvent immersion with copaiba oleoresin or leaf extract (bioactives-loaded 3D) were also analysed by FTIR spectroscopy.

Thermal analysis was performed by thermogravimetric (TGA) and calorimetric (DSC) measurements in a Shimadzu equipment (model DTA-50, and TGA-50, Brazil) to evaluate the stability and degradation profile of 3D matrix, copaiba oleoresin, leaf extract and 3D matrix containing copaiba leaf extract or oleoresin. The 3D matrix samples were exposed to 20% relative humidity (RH) for 24 h before analysis to normalize the humidity of the samples. For thermal degradation analysis the temperature range was 25 - 600 °C, at a constant heating rate of 10 °C/min under nitrogen atmosphere. All analyses were performed in duplicate.

In order to visualize the matrices to check their integrity scanning electron microscopy (SEM) micrographs of non-processed samples and impregnated/processed samples were obtained by the JEOL equipment (model JSM 6610 LV, Japan). The analysis was carried out at 10 to 15 kV, with different magnifications in the range of 50× to 2000×. The cross-section samples were obtained by cryofracture using liquid nitrogen and coating with gold (~300 Å) performed by the Desk V HP equipment (model Denton Vacuum, USA) [30].

The normal deformation coefficient (ϵ) of 3D matrix porous diameters was calculated using tabletop scanning electron microscopy. The assay was to evaluate the impregnation process effects on the SpongostanTM architectural organization. Micrographs were performed with the same samples, before and after organic solvent impregnation of copaiba compounds using a Hitachi equipment (model T3000, Japan), at 15 kV, with magnifications of 50× and 100× and porous diameter mean of 3D matrix were measured using the TM3000 software (Japan) [43] by Eq. 5.

$$\epsilon (\%) = \frac{\delta}{L_0} \times 100 \% \quad (5)$$

where δ and L_0 are the variation of porous diameters dimension and initial porous diameters dimension, respectively. All assays were carried out in duplicate.

Results and discussion

Yield of *C. luetzelburgii* leaf extract and trials for compounds of copaiba

In this work, the copaiba leaf extraction yield was 3 % (w/w) for *Copaifera luetzelburgii*. Moreover, the leaf extract screening was positive for the presence of polynuclear compounds, *i.e.* terpenoids, in agreement with literature [24,25,44]. It is interesting to highlight that the extractive collection of oleoresin from the trunk can be done over long periods, starting at 30 years of tree age, with an interval period of 1 year between a new collection [18], but the leaves can be obtained at less than a year intervals without compromising the tree growth. Thus, copaiba leaf extract compounds can be alternatively used for bioactive impregnation. Furthermore, chlorophyll is present in the leaf extract, which may be advantageous because it gives a green colour to the biomaterial, facilitating the distinction of the biomaterial in radiographs [9].

The copaiba leaf extract and oleoresin were characterized by qualitative phytochemical tests. The Liebermann-Burchard assays showed positive results for polynuclear compounds, *i.e.* terpenes. Terpenes were identified in both copaiba leaf extract and oleoresin. However, Dragendorff and Ferric chloride (5%) assays showed negative results for alkaloids and phenols. TLC assays revealed volatile compounds in copaiba oleoresin and leaf extract using anisaldehyde reference solutions, and fluorescent compounds were detected on leaf extract for UV-lamp (365nm). Terpene compounds are not fluorescent [45].

Antibacterial assays

Paper disks impregnated with 4 mg of *C. luetzelburgii* leaf extracts showed a bacterial growth inhibition halo of 12 ± 0.29 mm against *Staphylococcus aureus* Gram-positive (Figura 31), while paper disk impregnated with 8 mg of leaf extract did not show any antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negative (Tab. 4). The paper disk impregnated with 8 mg of copaiba oleoresin showed inhibition zone of 9 ± 0.11 mm against *Escherichia coli* Gram-negative, but with no inhibition against *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negative was observed. The paper disk impregnated with 4 mg of oleoresin showed inhibition zone of 10 ± 0.21 mm against *Staphylococcus aureus* Gram-

positive. This value agrees with the literature, where the paper disk impregnated with 2 μ L *Copaifera multijuga* oleoresin showed inhibition zone of 11 mm against *Bacillus subtilis* Gram-positive [15,16,46]. The 3D matrix impregnation of antibacterial bioactives can prevent the formation of a bacterial biofilm, mainly for Gram-positive bacteria which are commonly responsible for biofilm formation onto 3D matrices implanted for tissue regeneration purposes [9]. Gram positive bacteria has a cell structure that allows hydrophobic molecules to easily penetrate cells and act on the cell wall and cytoplasm, which is not the case of Gram-negative bacteria [47].

Tabela 4. Diameter of bacteria growth inhibition halo showed for disks impregnated with copaiba oleoresin or leaf extract. Values obtained from five replicates.

Bacteria	Impregnated mass	Inhibition halo diameter	
		leaf extract	oleoresin
<i>S. aureus</i>	4 mg	12 \pm 0.29 mm	10 \pm 0.21 mm
<i>E. coli</i>	8 mg	-	9 \pm 0.11 mm
<i>P. aeruginosa</i>	8 mg	-	-

Solubility studies

The solubility of copaiba oleoresin and leaf extract on organic solvents was assessed. The saturation limit data obtained for leaf extract samples was 15 g/L on HXN and 20 g/L on DCM, both at 35 °C. The copaiba oleoresin showed high solubility within a mass fraction range of 0.1 to 1.0 (w/w) for both solvents. Thus, the oil-solvent mixture formed a homogeneous transparent solution for all concentrations, with no sign of turbidity. This result is probably related to the heating of the oil-solvent system above its upper critical temperature [48].

The saturation point of the incorporation system usually represents a limit condition to avoid a heterogeneous impregnation on the 3D biomaterial matrix [13]. Considering that the refractive index of substances and mixtures are directly linked to their chemical composition, it can be used as a quality parameter for chemical samples. The mean refractive index obtained for copaiba oleoresin was 1.51187, which is in agreement with the literature [49]. This result remained the same after 5 months of assays, under 25 °C, preserving the compounds concentration of the copaiba oleoresin (Fig. 18).

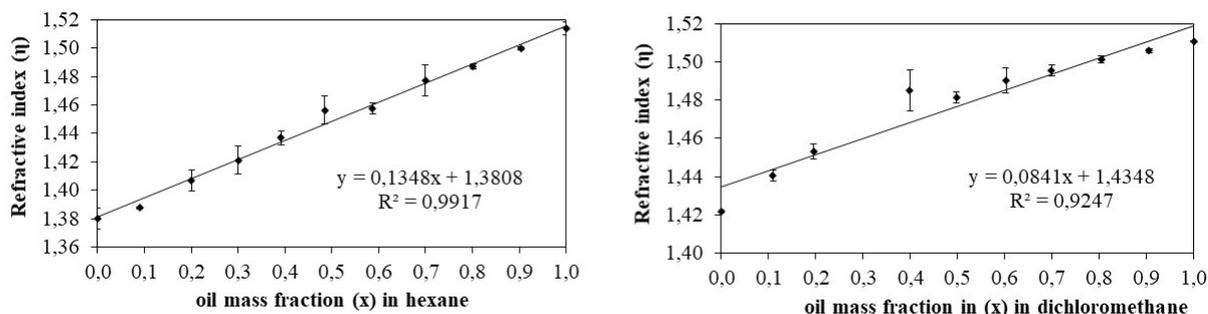


Figura 18. Solubility and refractive index assays of copaiba oleoresin and leaf extract in hexane and dichloromethane

DCM has a vapor pressure of 440 mmHg (20 °C), boiling point of 40 °C and density of 1.322 g/mL at 20 °C. HXN has a vapor pressure of 132 mmHg (20 °C), boiling point of 69 °C and the density of 0.659 g/mL at 25 °C [50]. These physicochemical profiles are generally favourable for the evaporation step of the matrix impregnation process. These solvents are commonly used in pharmaceutical industry processes, mainly in the synthesis and purification of drugs and in the cleaning of equipment. However, the solvent density can degrade a biopolymer and damage the spatial organization of 3D dressings leading to significant chemical changes and modifications of their mechanical proprieties and structural integrity. For leaf extracts the refraction index is not usually applied.

Chemical characterization of copaiba leaf extract and oleoresin

The chromatograms of oleoresin and leaf extract showed characteristics similar to those in the literature. Sesquiterpenes were obtained at a temperature range of 120 to 150 °C, while triterpenes were obtained at 310 °C [51]. The spectroscopic assays performed by GC-MS showed 12 bioactives substances in the copaiba oleoresin representing 76.1 % of volatiles fraction (Fig. 19) while for leaf extract 14 bioactives substances were recovered representing 53.3 % of the volatile fraction (Fig. 20). Sesquiterpene compounds represent more than 50 % of oleoresin composition, including β -caryophyllene (22.4 %), α -copaene (18.2 %), β -bisabolene (8.8 %), trans- α -bergamotene (6.9 %), δ -cadinene (6.2 %), α - α -caryophyllene (3.0 %), germacrene A (2.3 %), gurjunene (2.1 %), cubebene (1.9 %), α - γ -caryophyllene oxide (1.6 %), amorphene (1.5 %), and cis-Z- α -bisabolene epoxide (1.2 %). All these sesquiterpenes are known to possess a wide range of therapeutic activities in which their anti-inflammatory and antimicrobial profiles are commonly highlighted. The β -caryophyllene bioactive has been previously described to show antimicrobial activity against *Staphylococcus*

Capítulo 4. Resultados e Discussão

aureus [16]. On the other hand, the leaf extract was mostly composed of triterpenes, such as lupeol (36.6 %), β -amirin (5.5%), epitaraxerol (4.3%), lupenone (1.6 %), and taraxasterol (0.3 %), known for their anti-inflammatory and gastroprotective activity [49]. Lupeol was used in pre-treatment against carrageenan-induced hyperalgesia, where mice received subcutaneously 50 and 100 mg/kg lupeol doses in a hind paw, which inhibited the hyperalgesia and prevented the local increase in tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) showing anti-inflammatory action [52].

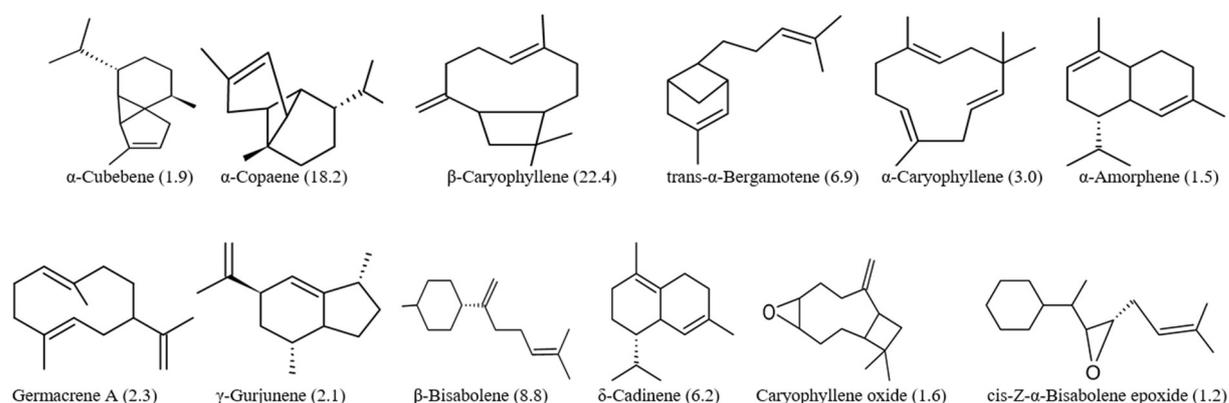


Figura 19. Chemical structure profile of copaiba oleoresin obtained by GC-MS with name of compounds and area % into brackets

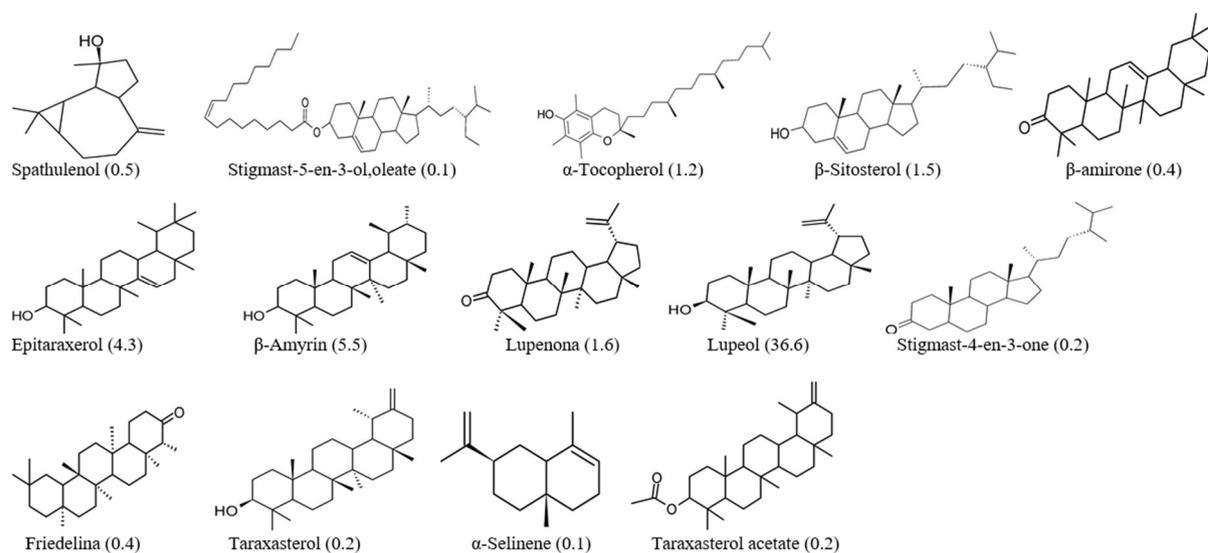


Figura 20. Chemical structure profile of copaiba leaf extract obtained by GC-MS with name of compounds and area % into brackets

The bioactive compounds of copaiba oleoresin and leaf extract were primarily identified by the equipment library, and the structural analysis of terpene compounds were determined by the analysis of ^1H (500 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR spectra, and FTIR spectra data. The ^{13}C NMR (MHz) spectra data retrieved from copaiba oleoresin depicted resonating carbons natural from β -caryophyllene and caryophyllene oxide bioactives, while the β -amyrin and lupeol were found for the leaf extract sample. Tab. 5 depicts internal carbon double bond (δ_{C} 105.4 to 111.0; δ_{H} 4.73 to 4.93), terminal carbon double bond (δ_{C} 109.0 to 120.0), carbon-oxygen bond of epoxides, and cyclopropane alcohols of copaiba oleoresin and leaf extract terpene structures. The NMR data were confirmed by the GC-MS results and were compared with previous data described in the literature, as shown in Fig. 25 and Fig. 26.

Terpene compounds are commonly found in several species from *Copaifera* sp. Phytochemical study of copaiba bioactives is important to define future therapeutic applications for a copaiba oleoresin or leaf extract impregnated 3D matrix. Taking into account the large number of different *Copaifera* sp. species and diverse biomes, the standardization of copaiba bioactives is not a trivial task. Thus, the development of a selective impregnation process of bioactives into matrices would be of great interest for medical applications [53].

Copaiba leaf extract and oleoresin impregnation into SpongostanTM

The copaiba leaf extract incorporation yield was 6.3 %, while for copaiba oleoresin this was 3.6 % for the same biopolymer-based 3D matrix (Fig. 21A), related to the initial mass of 300 mg. The immersion impregnation method obtained incorporation mass yields about twice higher than the supercritical solvent impregnation method for the oleoresin [30]. The load range of 11.2 to 19.3 mg of leaf-extract and oleoresin into 1 cm³ 3D dressing samples may represent a dosage in the therapeutic window range, especially for some local concentration applications with biological activities, which must be confirmed by biological tests. SpongostanTM dressing has been indicated for tissue regeneration treatment by means of homeostatic local action and stimulation of extracellular matrix production [5]. Thus, the development of copaiba based SpongostanTM dressings is an interesting alternative for local treatment of injured tissues through the action of the bioactive compounds.

Capítulo 4. Resultados e Discussão

Tabela 5. Experimental ^{13}C NMR spectra signal data from copaiba free oleoresin, 3D matrix-impregnated oleoresin, and free leaf extract and 3D matrix-leaf extract. The literature data obtained from Bohlmann et al., 1980 [60]^a, da Silva et al., 2013 [61]^b, Carvalho et al., 1998 [62]^c, and Luz et al., 2010 [63]^d

Sample	Oleoresin						Leaf extract					
	β -Caryophyllene			Caryophyllene oxide			β -Amyrin			Lupeol		
Bioactive	Experimental		Literature	Experimental		Literature	Experimental		Literature	Experimental		Literature
Data	Oleoresin	3D+Oil	(a)	Oleoresin	3D+Oil	(b)	Leaf extract	3D + Leaf	(c)	Leaf extract	3D + Leaf	(d)
^{13}C /Copaiba												
C1	48.5	48.5	48.2	151.6	151.6	151.8	38.7	38.7	38.7	38.6	38.6	38.6
C2	154.0	154.0	154.3	112.7	112.7	112.7	27.2	27.2	27.2	28.4	28.4	28.4
C3	40.4	40.4	40.4	63.8	63.7	63.7	79.1	79.1	79.6	79.0	79.0	79.0
C4	29.4	29.4	29.4	58.2	58.2	59.7	38.7	38.7	38.7	38.8	38.8	38.8
C5	124.5	124.5	124.5	50.7	50.7	50.8	55.1	55.1	55.1	55.3	55.3	55.2
C6	135.2	135.2	135.0	48.7	48.7	48.7	18.4	18.3	18.3	18.3	18.3	18.2
C7	34.8	34.8	34.8	39.8	39.7	39.8	32.8	32.8	32.8	34.2	34.2	34.2
C8	28.3	28.3	28.4	39.1	39.0	39.2	39.7	39.7	39.9	40.7	40.7	40.7
C9	53.6	53.6	53.6	33.5	33.5	34.0	48.2	47.7	47.7	50.4	50.4	50.3
C10	30.0	30.0	30.1	30.1	30.1	30.1	37.2	37.2	36.9	37.1	37.1	37.1
C11	40.0	40.0	40.0	29.8	29.8	29.9	23.9	23.9	23.6	20.9	20.9	20.9
C12	111.7	111.7	111.8	29.8	29.7	29.8	121.6	121.7	121.6	25.1	25.1	25.0
C13	30.0	30.0	30.1	27.2	27.2	27.2	144.7	144.7	144.7	38.0	38.0	38.0
C14	22.6	22.6	22.6	21.5	21.5	21.6	41.9	41.5	41.7	42.8	42.8	42.7
C15	16.3	16.3	16.3	16.9	16.9	16.9	26.4	26.9	26.1	27.4	27.4	27.4
C16							26.9	27.1	26.9	35.5	35.5	35.5
C17							33.9	33.9	33.7	42.9	42.9	42.9
C18							47.9	47.9	47.6	48.3	48.3	48.2
C19							45.8	45.8	46.7	47.7	47.7	47.9
C20							31.8	31.2	31.1	150.8	150.8	150.8
C21							34.7	34.2	34.7	29.8	29.8	29.8
C22							37.3	37.3	37.1	40.0	40.0	40.0
C23							28.4	28.4	28.4	27.9	27.9	27.9
C24							15.3	15.4	15.6	15.4	15.4	15.4
C25							15.5	15.6	15.7	16.1	16.1	16.1
C26							17.7	16.9	16.9	16.0	16.0	16.0
C27							26.4	26.6	26.1	14.5	14.5	14.5
C28							28.7	28.7	28.8	18.0	18.0	18.0
C29							33.1	33.1	33.4	109.3	109.3	109.3
C30							23.6	23.6	23.6	19.3	19.3	19.3

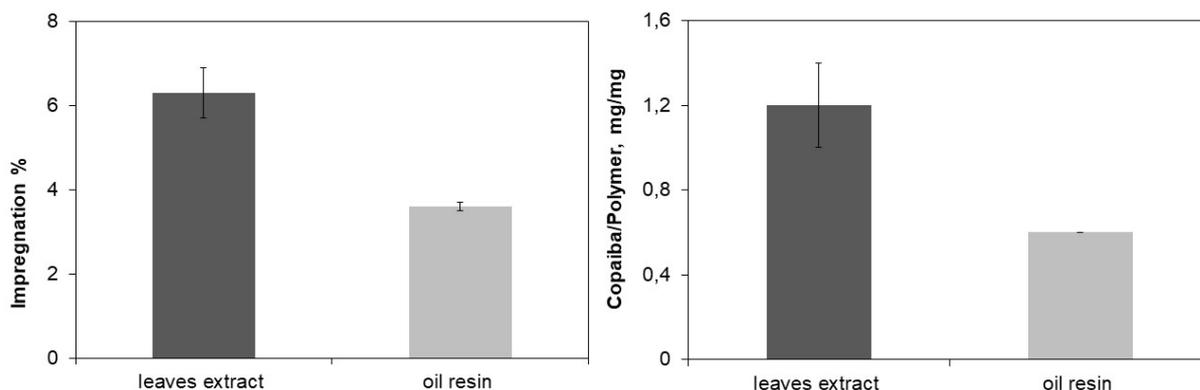


Figura 21. Copaiba leaf extract and oleoresin incorporated into 3D matrix dressings: impregnation yield (A) and copaiba mass (leaf-extract or oleoresin)/ polymer ratio (B)

In Furtado et al. [54], the cytotoxicity of copaiba oleoresin and leaf extract was evaluated in bone marrow micronucleus assay of male Swiss mice of 25 g weight, and the results showed no cytotoxicity in treatment using 2000 mg/kg intraperitoneal injection. In Vieira et al. [26], the copaiba oleoresin showed deleterious effects on wound healing of tissues, which were probably due to the prolongation of inflammation step, inducing the synthesis of growth factors that interfere with the serocellular crust formation. The natural wound healing process was affected, leading to the absence of reepithelization signs after 3 and 5 days. These tests were performed with 60 BALB/ce mice aged 2 to 3 months, submitted to a 1 cm linear surgical incision in the dorsal plane of the skin of the thoracic region. This was done to implant a 12 mm diameter glass slide into the subcutaneous tissue. In Paiva et al., [55], the copaiba oleoresin diluted solutions at 2 % and 4 % (w/w) were used in the treatment of dorsal wound healing model with 36 male albino Wistar rats, weighing 120-150 g, and was shown to accelerate the healing process and to avoid wound dehiscence. Thus, the dilution or indirect application of bioactive compounds from copaiba could solve this problem.

A mass ratio of 1.2 (w/w) was obtained for the leaf extract/polymer system, which was twice higher than that obtained for oleoresin/polymer, 0.6 (w/w) (Fig. 21B), while the partition coefficient of the samples values were of 6.4 (w/w) for leaf extract and 3.7 (w/w) for oleoresin. Furthermore, the quality of the incorporation process is not only associated to the amount impregnated, but also to the homogeneity of the impregnated mass on the 3D matrix. The higher the impregnation homogeneity throughout the dressing structure, the more controlled the release on the tissue avoiding dosing fluctuations.

The bioactive compounds effectively loaded onto a 3D matrix were investigated. Fig. 19 depicts the chemical structure of compounds present in the copaiba oleoresin and leaf extract (Fig. 20), retrieved from ^1H - and ^{13}C NMR spectra (Table 5). The oleoresin bioactive compounds identified on impregnated 3D matrix (3D + oil) were mostly β -caryophyllene and caryophyllene oxide, while for leaf extract impregnated matrices, lupeol and β -amyryn (3D + leaf) were found as major components. These data suggest that the immersion method did not lead to a significant change in chemical structure of the major compounds of copaiba oleoresin and leaf extract, which is an important factor for biological actives impregnation into 3D matrices. NMR analysis identified bioactive compounds from copaiba oleoresin and leaf extract impregnated in a commercial Spongostan dressing in a single analysis.

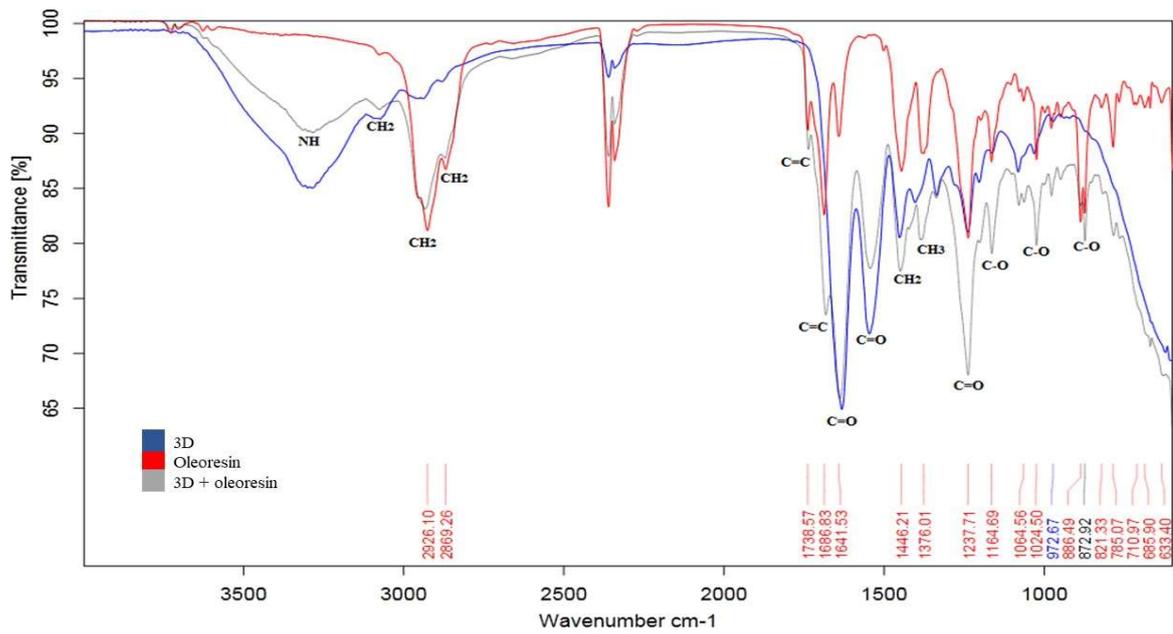
The FTIR spectroscopy analysis data of non-impregnated 3D matrix were compared with those obtained for copaiba oleoresin and leaf extract impregnated 3D matrixes. Tab. 6 shows the vibrational IR spectra of characteristic groups of gelatin from the 3D matrix with large strong bands of peptide N–H stretching, strong bands of amide I, amide II and amide III characteristic of amide carbonyl C=O stretching, and at 1031 cm^{-1} was CH_3 of amide [56]. The copaiba oleoresin showed strong bands from terpene aliphatic structures CH_2 , CH_3 , and vibrational stretching from endocyclic and exocyclic systems C=C presented in some bioactives of oleoresin. The epoxy structure C–O–C was present in oleoresin highlighted by strong bands of asymmetric C–O and symmetric C–O ring deformations [57,58]. IR spectra of copaiba leaf extract showed hydroxyl group O–H, and a strong band was found from terpene aliphatic structures CH_2 , CH_3 . Vibrational signs from carbon double bond groups were also retrieved with stretching vibrational from endocyclic and exocyclic systems C=C [57,58], and the chloroform solvent signal showed strange bands at 754.

Tabela 6. FTIR chemical profile of copaiba free oleoresin, 3D matrix-impregnated oleoresin (3D + oil), and free leaf extract and 3D matrix-leaf extract (3D + leaf)

Band (cm ⁻¹)	Group	Samples	Reference
754	CCl ₃	Leaf extract	[55]
873	C–O	Oleoresin	[55]
886		3D + oil	
977	C–O–C	Oleoresin	[55]
1164			
1237			
1031	CH ₃	Spongotan™	[53]
1376	CH ₂ , CH ₃	Leaf extract	[54]
1446		Oleoresin	
1239	C=O	Spongotan™	[53]
1546		3D + leaf	
1631		3D + oil	
785	C=C		[54, 55]
1686			
1641	C=C		[54, 55]
1738			
2849	CH ₂ , CH ₃	Leaf extract	[54]
2916		Oleoresin	
		3D + leaf	
		3D + oil	
2880	CH ₂ , CH ₃		[53]
2957			
3385	O–H		[54, 55]
3200	NH		[53,56]
3500			

Fig. 22A shows the vibrational groups of 3D + oil system in which the peptide vibrational band of amide N–H (3500–3200 cm⁻¹) is preserved as a structural characteristic of gelatin 3D matrices. In the same sample, strong bands were found at 2926 cm⁻¹, 2869 cm⁻¹ of aliphatic structures CH₂ and CH₃ natural from copaiba oleoresin. The spectroscopic assay of copaiba leaf extract impregnated 3D matrix showed clearly vibrational bands of gelatin 3D matrix at 1640 cm⁻¹ (amide II) and 1541 cm⁻¹ (amide III) characteristic of amide carbonyl C=O stretching, while vibrational bands characteristic of the leaf extract were clearly observed at 1733 cm⁻¹ stretching vibrational to endocyclic and exocyclic systems C=C (Fig. 22B).

A)



B)

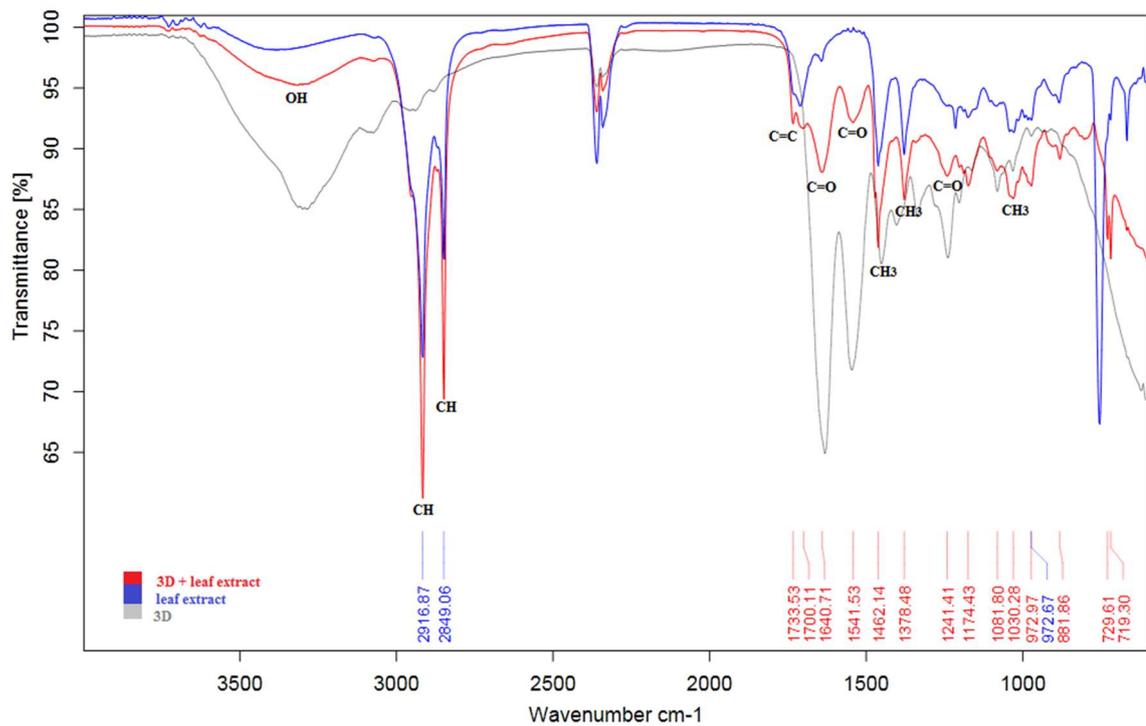


Figura 22. Infrared spectra of non-impregnated 3D matrix, copaiba oleoresin and incorporated oleoresin 3D matrix (A), and non-impregnated 3D matrix, copaiba leaf extract, and incorporated leaf extract 3D matrix (B)

DSC/TGA analysis revealed the thermic events of the material used in the impregnation process (Tab. 7). Copaiba oleoresin exhibited events with maximum temperature at 167 °C and 302 °C (Fig. 27), typical of evaporation and degradation endothermic phenomena, respectively [15]. Copaiba leaf extract showed evaporation at a maximum temperature of 96 °C along with a 19 % weight loss. Further, the leaf extract compounds presented higher evaporation and decomposition temperatures at 307 and 419 °C, respectively, when compared to oleoresin. The first event of the non-impregnated 3D matrix occurred at a maximum temperature between 60 °C and 94°C, which can be related to overlapping events, such as the denaturation of the gelatin material and evaporation (Fig. 28). Then, another 3 events were detected at 313, 344 and 377 °C related to different steps of degradation and decomposition of the gelatin peptide chain, according to the literature [59]. The first event detected for oleoresin impregnated 3D matrix occurred at a maximum temperature of 58 °C, typically attributed to gelatin. The second event at a maximum temperature of 158 °C was attributed to the evaporation of copaiba volatile compounds. Other events detected at maximum temperatures of 269 and 339 °C are probably related to the degradation, respectively, of both the oil and the 3D matrix. The thermograms obtained from the copaiba leaf extract impregnated 3D matrix samples showed three thermic events at 60, 175 and 308 °C. The vibrational bands of 3D + leaf and 3D + oil were typical of organic product (leaf extract or oleoresin) and non-processed SpongostanTM, with no evidence of chemical bonds formation or breaking after impregnation process (Fig. 22).

Tabela 7 . Thermal analysis of 3D matrix, copaiba oleoresin and leaf extract. The maximum temperature of all events was retrieved in °C. All values obtained from duplicates

Samples	Weight loss at 100 °C (%)	Evaporation	1 ^a Degradation	2 ^a Degradation	Decomposition
Oleoresin	-	167 ± 10*	302 ± 18*	-	-
Leaf extract	19 ± 1	96 ± 2*	307 ± 0*	419 ± 16*	-
3D	10 ± 1	87 ± 7*	313 ± 1*	344 ± 11*	377 ± 31*
3D + Oleoresin	8 ± 1	58 ± 2	158 ± 1	269 ± 1	339 ± 1
3D+ Leaf-Extract	8 ± 1	60 ± 3	175 ± 1	308 ± 4	-

*Temperature values were determined as the peak maximum in the first derivative curve of thermographs.

Non-impregnated 3D matrices, copaiba oleoresin and leaf extract impregnated 3D matrices were cryo-fractured with nitrogen and analysed by SEM (Fig. 23). The impregnation homogeneity effects can be analyzed by micrographic images of the incorporated material. The micrographs showed a homogeneous superficial distribution of copaiba oil on the 3D matrix, with micro-wrinkles of oleoresin on the dressing structure of a 10-20 µm diameter elliptic

form. Similar data were acquired from supercritical solvent impregnation (SSI/SSD) method described previously in the literature [3;0]. The images of copaiba leaf extract impregnated samples showed amorphous particulate material from the leaf extract on the 3D matrix surface with around 10 μm sizes. The SEM analysis of 3D + oleoresin and 3D + leaf extract samples indicated that both plant materials were impregnated on the surface of the dressing preserving the spatial organization of the foam type-biopolymeric structure of SpongostanTM. Fig. 24 depicts the measured normal deformation of SpongostanTM dressings. Tab. 8 shows that 60 % of the porous diameter of dressings processed into DCM presented $\varepsilon < 5$ %, while normal deformation of the 3D matrix processed into HXN showed that only 36 % of porous diameter provided $\varepsilon < 5$ %. Fig. 24 images show that the process condition ruptured the fibre-like structure of SpongostanTM material using DCM. In other words, the impregnation process using HXN did not cause any material changes.

Tabela 8. Average normal deformation of 3D matrix dressing processed by immersion method in HXN and DCM without copaiba compounds

Wound dressing	Normal deformation %	HXN	DCM
3D matrix	$\varepsilon \leq 5$	35.6	59.5
	$5 < \varepsilon < 10$	37.8	35.1
	$\varepsilon \geq 10$	26.7	5.4

The organic solvent immersion method used to impregnate copaiba leaf extract or oleoresin into SpongostanTM wound dressing proved to be efficient for the incorporation of bioactive compounds on the surface or into the 3D matrix. Moreover, the results of antimicrobial activity of SpongostanTM gelatin dressing impregnated with copaiba leaf extract or oleoresin showed that the extracellular matrix, swelling and mechanical proprieties of these materials can be promising. Therefore, further investigation on healing wound using the copaiba bioactive impregnated into dressings will be carried out.

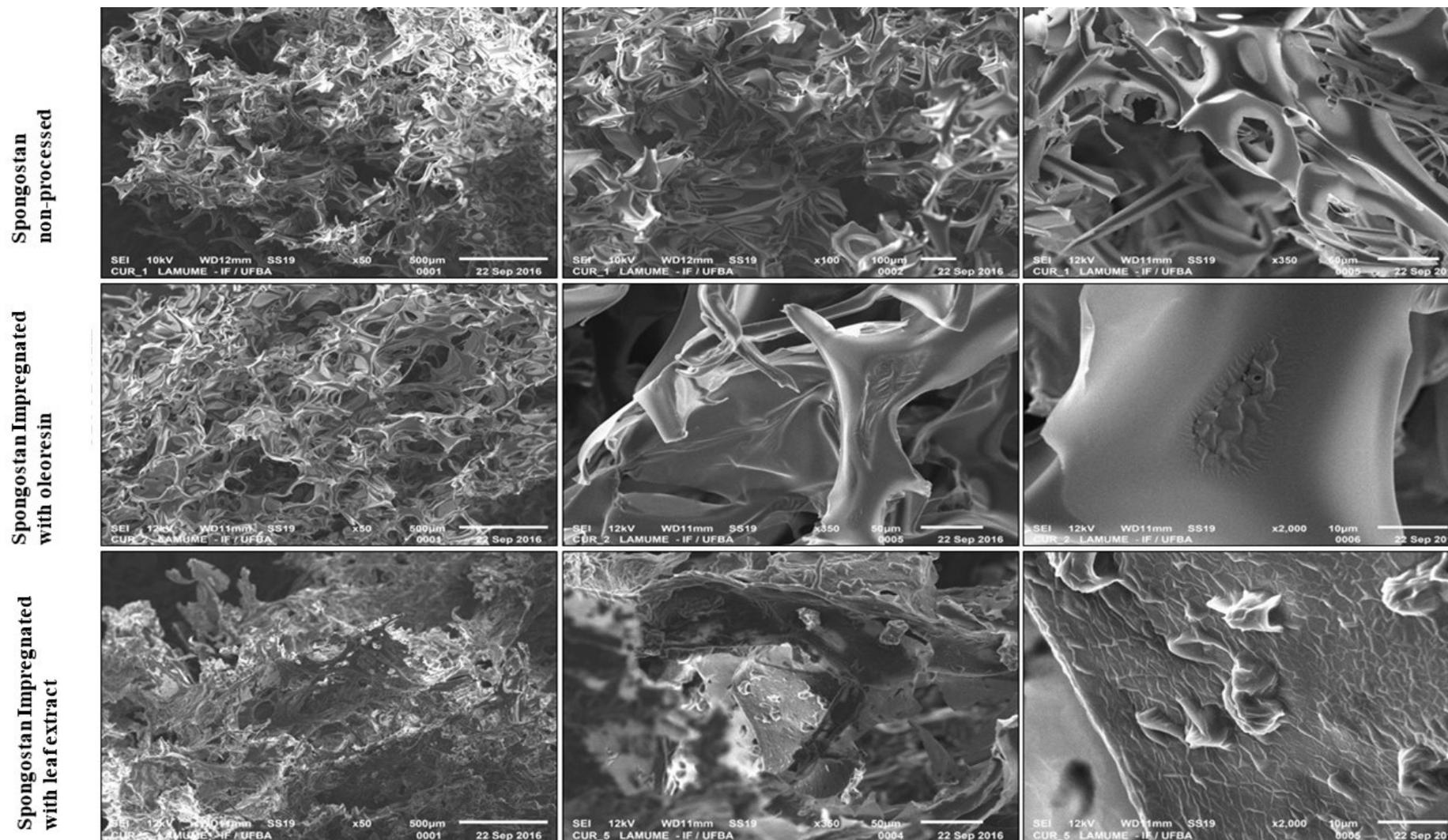


Figura 23. SEM micrographs of non-impregnated 3D matrix dressings at 50 \times , 100 \times and 350 \times magnifications, and SEM of impregnated 3D matrices at 50 \times , 350 \times and 2000 \times magnifications

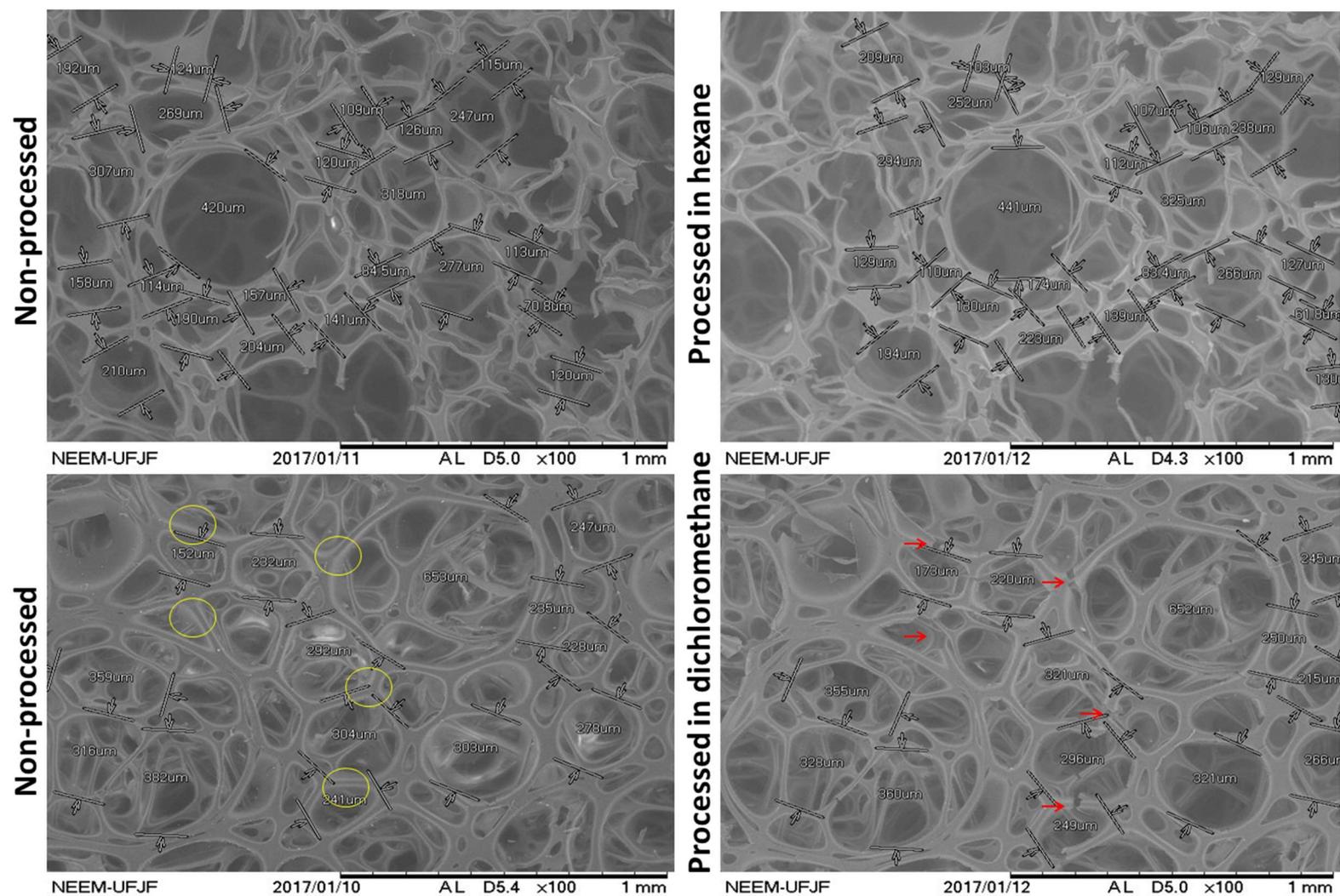


Figura 24. SEM micrographs for non-processed and processed 3D matrix dressings with DCM and HXN organic solvent at 100× magnification

Conclusion

Copaiba oleoresin can be an efficient antimicrobial agent against *S. aureus* and *E. coli* bacteria, while the leaf extract exhibits activity against *S. aureus* bacterium. The immersion method succeeded in impregnating 19 mg of leaf extract and 11 mg of oleoresin into 1 cm³ of SpongostanTM dressings. NMR and FTIR spectra confirmed that the major bioactive compounds of copaiba oleoresin and leaf extract were successfully impregnated into three-dimensional gelatin dressings. These results are very promising with regard to the preservation of the chemical structures of copaiba compounds, along with the maintenance of the spatial organization of foam 3D matrix without significant damage to the gelatin-based material observed by SEM analysis. Complementary in vitro/ex vivo/in vivo studies must be carried out to assess the release kinetics and the wound healing profile of the copaiba compound impregnated 3D matrix.

Acknowledgement

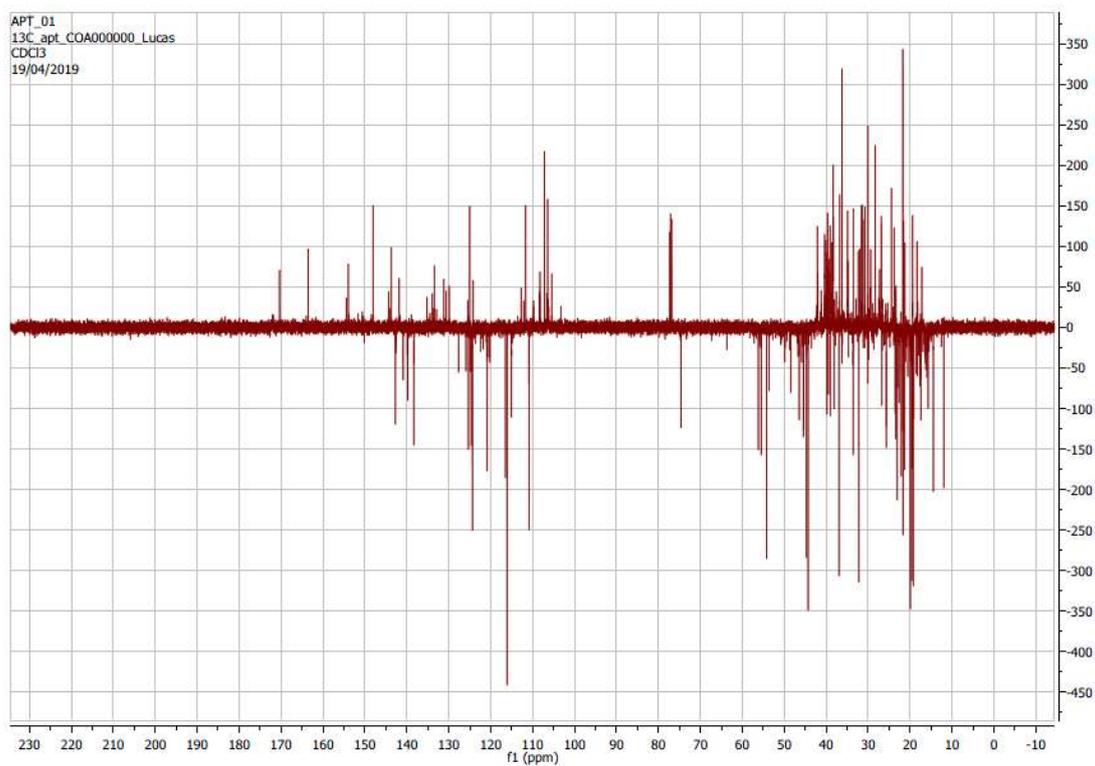
This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. This work was also financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT/CAPES, Portugal, FCT/2650/12/3/2013/S), through the Project FCT-MEC (PEst-C/EQB/UI0102/2019). The financial support to D.R.C. Pascoal and M.E.M. Braga (SFRH/BPD/101048/2014) is gratefully acknowledged. The authors are thankful to Jorge Antonio Silva Costa for donation of the aerial parts of *Copaifera luetzelburgii*, Luiz Fernando Cappa de Oliveira (UFJF) for SEM analysis, Josean Fachine and Lucas Silva Abreu (UFPB) for NMR analysis. SpongostanTM donation by Ferrosan Medical Devices (Denmark) is also acknowledged.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Supplementary material

A



B

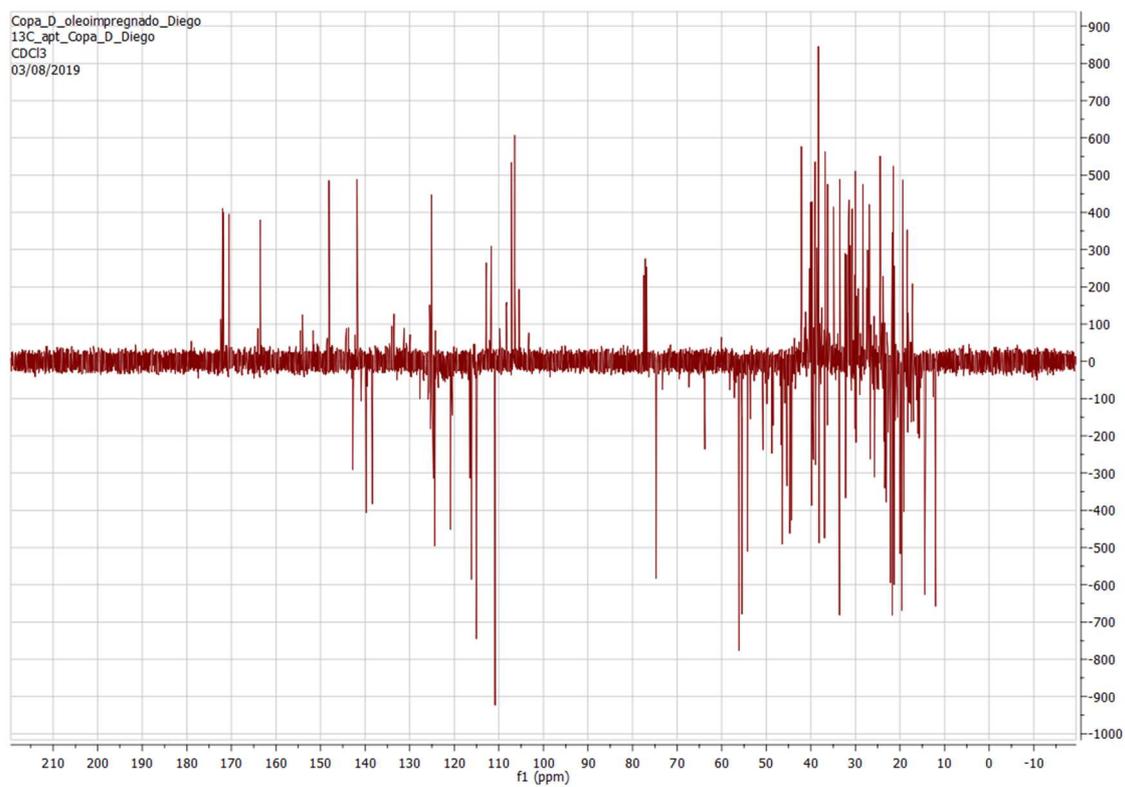
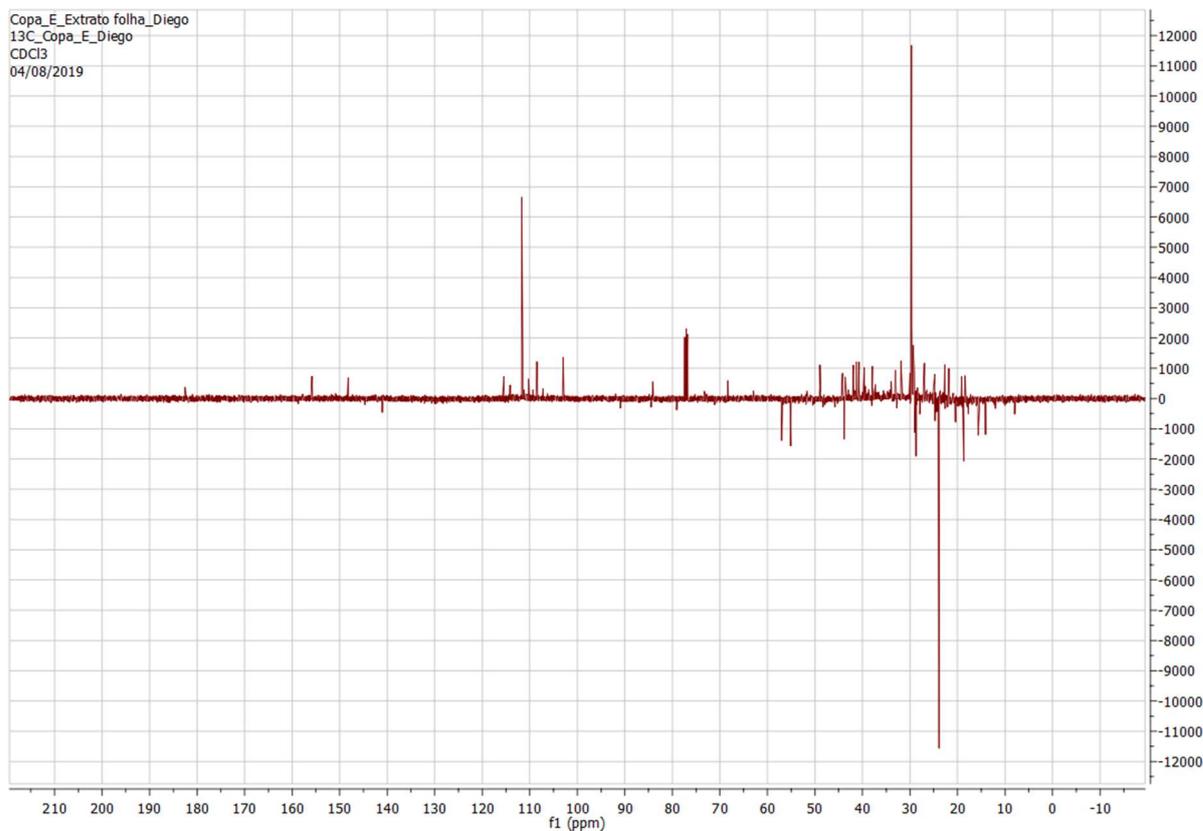


Figura 25. ^{13}C NMR spectral of copaiba oleoresin (A) and ^{13}C NMR spectral of copaiba oleoresin impregnated 3D matrix (B) recorded at 500 MHz with a room temperature probe

A



B

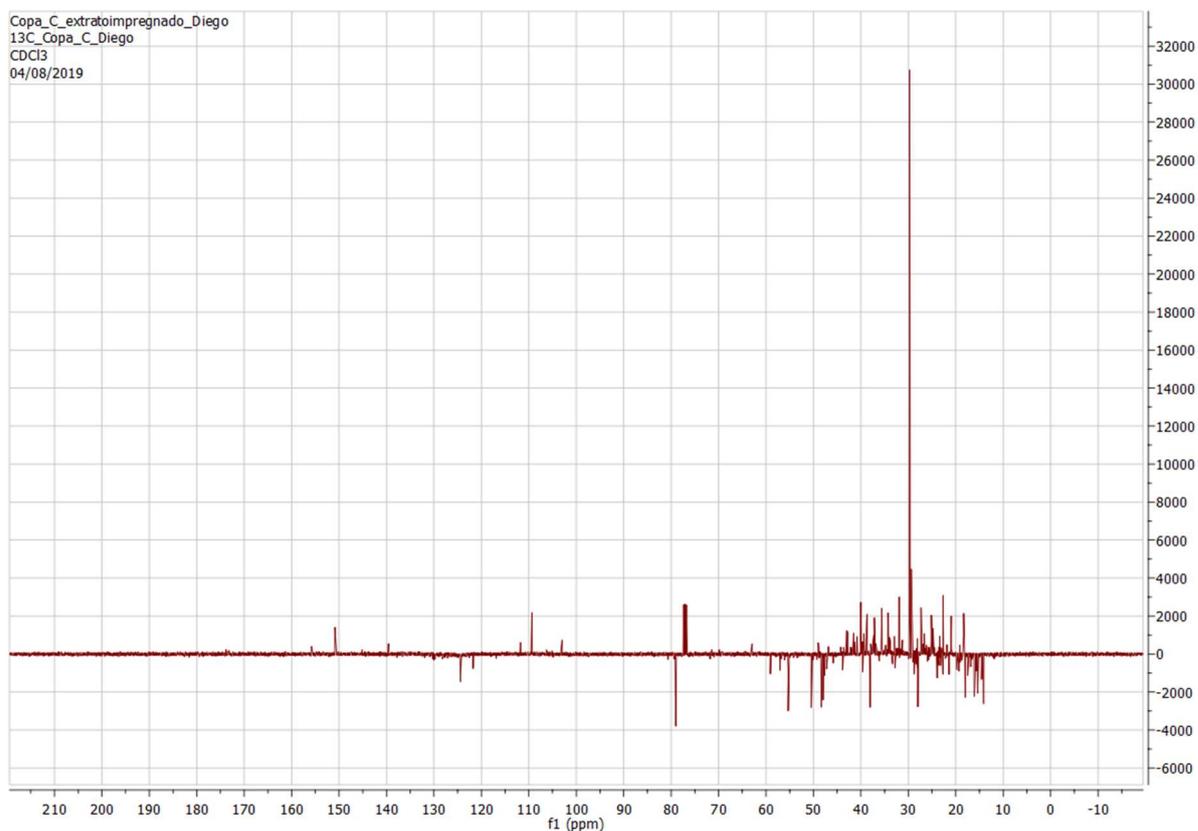


Figura 26. ^{13}C NMR spectral of copaiba leaf extract (A) and ^{13}C NMR spectral of copaiba leaf extract impregnated 3D matrix (B) recorded at 500 MHz with a room temperature probe

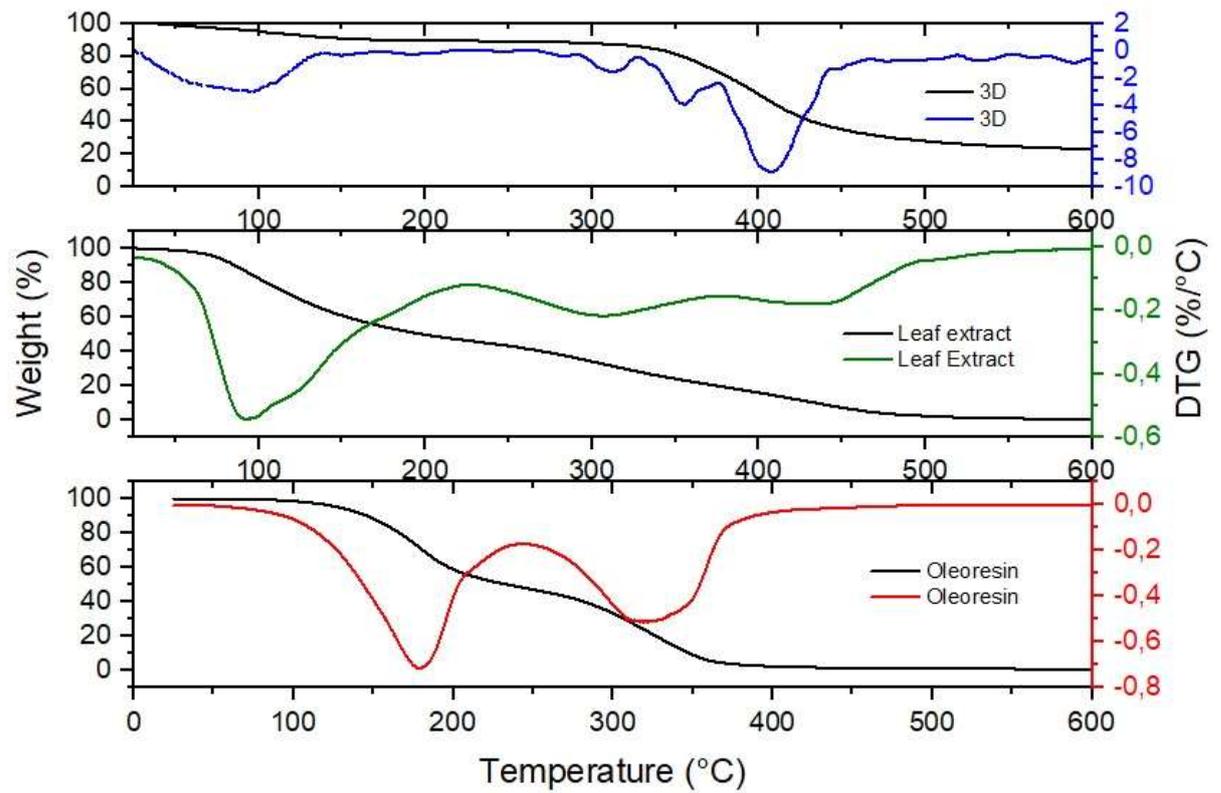


Figura 27. Thermogravimetric curve (TG) and first derivative thermogravimetric curve (DTG) of 3D, copaiba leaf extract and oleoresin samples

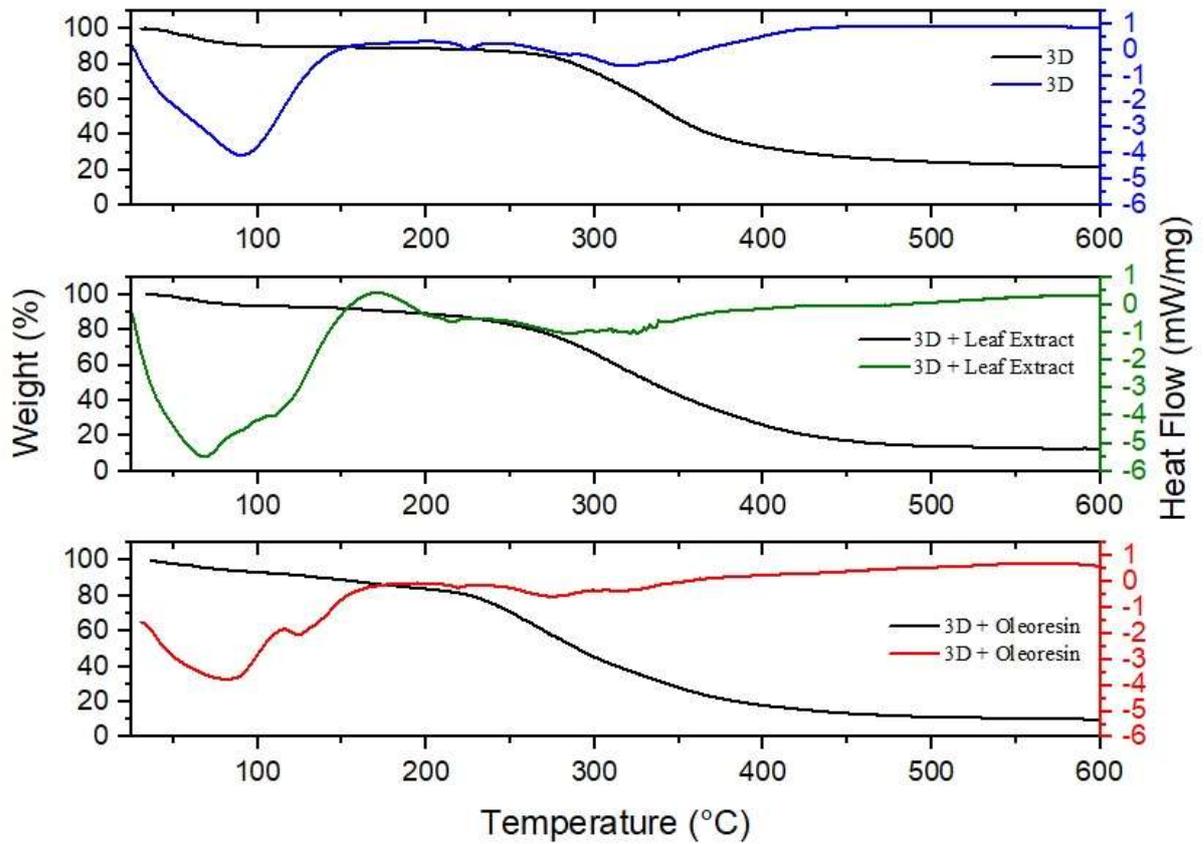


Figura 28. Thermogravimetric curve (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) of 3D, 3D + leaf extract and 3D + oleoresin

References

1. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. *J Pharm Sci.* 2015;104(11):3653–80.
2. Langer R. Biomaterials and biotechnology: From the discovery of the first angiogenesis inhibitors to the development of controlled drug delivery systems and the foundation of tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2013;101 A(9):2449–55.
3. Moura LIF, Dias AMA, Carvalho E, De Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review. *Acta Biomater.* 2013;9(7):7093–114.
4. Yeo GC, Mithieux SM, Weiss AS. The Elastin Matrix in Tissue Engineering and Regeneration. *Curr Opin Biomed Eng.* 2018;6:27–32.
5. Anders JO, Mollenhauer J, Beberhold A, Kinne RW, Venbrocks RA. Gelatin-based haemostyptic Spongostan as a possible three-dimensional scaffold for a chondrocyte matrix? An experimental study with bovine chondrocytes. *J Bone Jt Surg - Ser B.* 2009;91(3):409–16.
6. Dias AMA, Rey-Rico A, Oliveira RA, Marceneiro S, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *J Supercrit Fluids.* 2013;74:34–45.
7. da Silva CV, Pereira VJ, Rosa PTV, Cabral-Albuquerque ECM, Vieira de Melo SAB, Costa GMN, et al. Effect of scCO₂ sorption capacity on the total amount of borage oil loaded by scCO₂ impregnation into a polyurethane-based wound dressing. *J Supercrit Fluids.* 2016;115:1–9.
8. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2892–923.
9. Hendriks JGE, Van Horn JR, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials.* 2004;25(3):545–56.
10. Klangjorhor J, Nimkingratana P, Settakorn J, Pruksakorn D, Leerapun T, Arpornchayanon O, et al. Hyaluronan production and chondrogenic properties of primary human chondrocyte on gelatin based hemostatic spongostan scaffold. *J Orthop Surg Res.* 2012;7(1):1–8.
11. Wu, K., Chen, Y. C., Hsu, Y. M., Chang CH. Antibiotic-loaded Bone Cement Using Porogens. *J Am Acad Orthop Surg.* 2016;24:188–95.
12. Wu W qiang, Peng S, Song Z yuan, Lin S. Collagen biomaterial for the treatment of myocardial infarction: an update on cardiac tissue engineering and myocardial regeneration. *Drug Deliv Transl Res.* 2019;9(5):920–34.
13. Braga MEM., Matos MBC., Dias AMA., Sousa HC. Desenvolvimento de aplicações farmacêuticas e biomédicas através de métodos de impregnação/deposição com fluido supercrítico. In: H. C. Sousa, M. E. M. Braga AS, editor. *Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados.* Coimbra: Universidade de Coimbra; 2015. p. 309 – 383.
14. Deniz B, Oguzhan KR, Erdem O, Hasan S, Fuat YY, Muge O. The effects of different packing materials on healing and hearing after trauma to middle ear mucosa, an experimental study in rats. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg.* 2019;40(3):347–52.
15. Morelli CL, Mahrous M, Belgacem MN, Branciforti MC, Bretas RES, Bras J. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. *Ind Crops Prod.* 2015;70:134–41.
16. Maragon, C. A., Martins, V. C. A., Leite, P. M. F., Santos, D. A., Nitschke, M., Plepis AMG. Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. *Ind Crops Prod.* 2017;99:163 – 171.
17. Bonan, R. F., Bonan, P. R. F., Batista, A. U. D., Sampaio, F. C., Albuquerque, A. J. R., Maria

- C.B. Moraes, M. C. B., Luiz H.C., Mattos O, L. H. C., Glenn, G. M., Medeiros, E. S., Oliveira, J. E. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Mater Sci Eng C*. 2015;48:372 – 377.
18. Veiga VF, Pinto AC. O Gênero *Copaifera* L. *Quim Nova*. 2002;25(2):273–86.
 19. Santiago KB, Conti BJ, Andrade BFMT, Silva JJM da, Rogez HLG, Crevelin EJ, et al. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. *Biomed Pharmacother*. 2015;70:12–8.
 20. Xavier-Junior, F. H., Egito, E. S. T., Morais, A. R. V., Alencar, E. N., Maciuk, A., Vauthier C. Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2018;536:251–8.
 21. Bardaji DKR, da Silva JJM, Bianchi TC, de Souza Eugênio D, de Oliveira PF, Leandro LF, et al. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe*. 2016;40:18–27.
 22. Brunharoto AR, Bastos JK, Silva AAB. Method for preparing matrix micro-particles of *Copaifera langsdorffii* (aerial parts) and for isolating the active principles therein. WO2011120118 (A1), 2011. p. 1–42.
 23. Batista ÂG, Ferrari AS, Da Cunha DC, Da Silva JK, Cazarin CBB, Correa LC, et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem*. 2016;197:1153–9.
 24. Botelho JRS, Santos AG, Araújo ME, Braga MEM, Gomes-Leal W, Carvalho Junior RN, et al. Copaiba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. *J Supercrit Fluids*. 2015;98:167–71.
 25. Lemos M, Santin JR, Mizuno CS, Boeing T, De Sousa JPB, Nanayakkara D, et al. *Copaifera langsdorffii*: Evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Brazilian J Pharmacogn*. 2015;25(3):238–45.
 26. Vieira RC, Bombardiere E, Oliveira JJ, Lino RS, Brito LA, Junqueira-Kipnis AP. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. *Pesqui Vet Bras*. 2008;28(8):358–66.
 27. Altiock D, Altiock E, Tihminlioglu F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(7):2227–36.
 28. Schierholz JM, Steinhäuser H, Rump AFE, Berkels R, Pulverer G. Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: Morphological and structural features. *Biomaterials*. 1997;18(12):839–44.
 29. Teixeira A, Neto C, Elys T, Arruda P, Thays T, Luís S, et al. Análise comparativa entre o óleo-resina de copaíba e o digluconato de clorexidina no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. *Rev Odontol da UNESP*. 2005;34(2):107–12.
 30. Pascoal DRC, Cabral-Albuquerque ECM, Velozo ES, de Sousa HC, de Melo SABV, Braga MEM. Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: A potential alternative topical antileishmanial treatment. *J Supercrit Fluids*. 2017;129:106–15.
 31. Alves IM, Abreu LS, Costa COS, Le Hyaric M, Lenise M, Guedes S, et al. Pyranochromones from *Dictyoloma vandellianum* A. JUSS and Their Cytotoxic Evaluation. *Chem Biodivers*. 2017;14:1–5.
 32. Trindade FTT, Stabeli RG, Pereira AA, Facundo VA, Silva A de A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles*

- darlingi and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Brazilian J Pharmacogn.* 2013;23(3):464–70.
33. Tobouti PL, de Andrade Martins TC, Pereira TJ, Mussi MCM. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:93–9.
 34. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(4):O255–66.
 35. Da Silva C V, Reis AL V, Ferrer SR, Guerreiro HMN, Barros TF, Da E, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. *Rev Bras Farmacogn Brazilian J Pharmacogn.* 2010(3):355–60.
 36. Mohsen-Nia M, Jazi B, Amiri H. Binodal curve measurements for (water + propionic acid + dichloromethane) ternary system by cloud point method. *J Chem Thermodyn.* 2009;41(7):859–63.
 37. Li WB, Segrè PN, Gammon RW, Sengers J V., Lamvik M. Determination of the temperature and concentration dependence of the refractive index of a liquid mixture. *J Chem Phys.* 1994;101(6):5058–69.
 38. Braga MEM, Pato MTV, Silva HSRC, Ferreira EI, Gil MH, Duarte CMM, et al. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *J Supercrit Fluids.* 2008;44(2):245–57.
 39. Costa VP, Braga MEM, Duarte CMM, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Gil MH, et al. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation. *J Supercrit Fluids.* 2010;53(1–3):165–73.
 40. Do Nascimento ME, Zoghbi M das GB, Brasil Pereira Pinto JE, Vilela Bertolucci SK. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. *Biochem Syst Ecol.* 2012;43:1–6.
 41. Stein SE, Linstrom P, Mirokhin Y, Tchekhovskoi D, Yang X, Gary W, et al. NIST 14 MS Database and MS Search Program v.2.2 NIST Standard Reference Database 1A NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 14) and NIST Mass Spectral Search Program (Version 2.2) For Use with Microsoft® Windows User's Guide The NIST Mass Spectrometry D. Nist. 2011;(June 2008):1–49.
 42. Santos, R. C., Espírito-Santo, R. F., Abreu, L. S., Oliveira, A. L., Fontes, L. D., Tavares, F. J., Silva, M. S., Soares, M. B. P., Velozo, E. S., Villarreal CF. Fluorescent Canthin-6-one Alkaloids from *Simaba bahiensis*: Isolation, Identification, and Cell-Labeling Properties. *Chempluschem.* 2019;84:260 – 267.
 43. Hitachi-Hitec. Tabletop Microscope Hitachi [Internet]. [cited 2019 Feb 15]. Available from: http://192.126.93.230/~ncimicro/wp-content/uploads/2018/02/TM3000_Brochure.pdf
 44. Nogueira MS, Furtado RA, Bastos JK. Flavonoids and Methoxy-galloylquinic Acid Derivatives from the Leaf Extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. *J Agric Food Chem.* 2015;63(31):6939–45.
 45. Wagner, H., Bladt S. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas.* 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1996. 355 – 357 p.
 46. Masson, D. S., Salvador, S.L., Polizello, A.C.M., Frade MA. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. *Rev Bras Plantas Med.* 2013;15:664 – 669.
 47. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 2013;6(12):1451–74.
 48. Smith, J. M.; Van Ness, H. C.; Abbot MM. *Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics.* 7th ed. New York, United States: McGraw-Hill; 2007. 626 p.

49. Gottlieb, O. R.; Iachan A. Estudo do bálsamo de copaíba. *Rev química Ind.* 1945;20–1.
50. PubChem Database. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 10]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
51. Veiga, Valdir F., Pinto AC. Constituintes Químicos das Cascas de *Copaifera langsdorfii* Desf Constituents from Bark Extracts of. *Rev Fitos.* 2006;2(01):59–64.
52. De Lima FO, Alves V, Filho JMB, Da Silva Almeida JRG, Rodrigues LC, Soares MBP, et al. Antinociceptive effect of lupeol: Evidence for a role of cytokines inhibition. *Phyther Res.* 2013;27:1557–63.
53. Souza Barbosa PC, Moreira Wiedemann LS, Da Silva Medeiros R, De Tarso Barbosa Sampaio P, Vieira G, Florêncio Da Veiga-Junior V. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chem Biodivers.* 2013;10(7):1350–60.
54. Furtado RA, de Oliveira PF, Senedese JM, Ozelin SD, de Souza LDR, Leandro LF, et al. Assessment of genotoxic activity of oleoresins and leaves extracts of six *Copaifera* species for prediction of potential human risks. *J Ethnopharmacol.* 2018;221:119–25.
55. Paiva LAF, De Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa N V., Silveira ER, Rao VSN. Investigation on the Wound Healing Activity of Oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in Rats. *Phyther Res.* 2002;16(8):737–9.
56. Ibrahim, M., Mahmoud AA, Osman O, Abd El-Aal M, Eid M. Molecular spectroscopic analyses of gelatin. *Spectrochim Acta Part a Mol Biomol Spectrosc.* 2011;81(1):724–9.
57. Gaspar AS, Wagner FE, Amaral VS, Costa Lima SA, Khomchenko VA, Santos JG, et al. Development of a biocompatible magnetic nanofluid by incorporating SPIONs in Amazonian oils. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2017;172:135–46.
58. Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan J. *Introduction to Spectroscopy.* 7th ed. Unites States of American: Cengage Learning; 2010. 32 – 82 p.
59. Raja IS, Fathima NN. A gelatin based antioxidant enriched biomaterial by grafting and saturation: Towards sustained drug delivery from antioxidant matrix. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2015;128:537–43.
60. Bohlmann F, Zdero C, Robinson H, King RM. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. *Phytochemistry.* 1980;19(11):2381–5.
61. Da Silva JMR, Bitencourt TB, Moreira MA, Da Graça Nascimento M. Enzymatic epoxidation of β -caryophyllene using free or immobilized lipases or mycelia from the Amazon region. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;95:48–54.
62. De Carvalho MG, Velandia JR, De Oliveira LF, Bezerra FB. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Quim Nova.* 1998;21(6):740–3.
63. Luz SM, Souza Filho APS, Guilohn GMSP, Vilhena KSS. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH1. *Planta Daninha.* 2010;28(3):479–87.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES

CONCLUSÃO

Essa tese de doutorado estudou comparativamente dois métodos de impregnação/deposição de compostos bioativos da copaíba, oriundos do extrato de folhas e do oleorresina: o método SSI/SSD e a impregnação/deposição por imersão em solvente orgânico.

No primeiro método, os curativos comerciais SpongostanTM, a base de gelatina suína, e Promogran[®], celulose regenerada e colágeno, foram utilizados como matriz biopolimérica para impregnar/depositar oleorresina de copaíba pelo SSI/SSD. Neste processo foi possível realizar ajustes finos, como controlar a quantidade de massa total incorporada e do composto bioativo majoritário, através das condições operacionais do processo, pressão e concentração inicial do produto natural. Através do processo SSI/SSD impregnou-se/depositou-se oleorresina numa faixa de 0,06 mg a 4,7 mg por mg de biopolímero. Todos os processos foram realizados na isoterma de 45 °C, variando as pressões de 137 bar, 190 bar, 317 bar, que correspondem respectivamente as densidades de 701 kg/m³, 801 kg/m³, 900 kg/m³. O β-cariofileno foi identificado como composto majoritário do oleorresina de copaíba, sendo impregnado/depositado com sucesso pelo SSI/SSD, confirmado por CG-FID. Na estrutura física foi observado que o curativo SpongostanTM teve uma redução na área de superfície, quando processado a pressões superiores a 190 bar, mas o mesmo não ocorreu para o curativo Promogran[®]. Os curativos impregnado/depositados com oleorresina de copaíba apresentaram estabilidade térmica até 100 °C, sem apresentar quebra ou formação de ligações químicas nessa faixa de temperatura. Esse resultado, associado ao efeito plastificante da Spongostan impregnada/depositada com óleo de copaíba e as imagens de micrografias, é um indicio que o SSI/SSD é capaz de incorporar a nível molecular entre as cadeia carbônicas do biopolímero. Analisando os resultados de rendimentos de impregnação/deposição do óleo nos curativos, observou-se, para o sistema SpongostanTM/scCO₂/oleorresina, que a solubilidade do oleorresina no scCO₂ foi o principal fator que influenciou o processo. Enquanto, para o sistema Promogran[®]/scCO₂/oleorresina foi a solubilidade do oleorresina no solvente, associada com a afinidade química do biopolímero ao scCO₂ e o oleorresina simultaneamente. Através dos resultados de rendimentos de óleo impregnado/depositado nos curativos, foi possível observar que a solubilidade do oleorresina no scCO₂ teve um aumento diretamente proporcional ao aumento da pressão. A tecnologia SSI/SSD com oleorresina de copaíba em curativos comerciais apresentou vantagem por não necessitar da etapa de secagem, o que pode contribuir para sua aplicação em escala industrial.

No segundo método, o curativo comercial SpongostanTM continuou sendo usado como base biopolimérica para impregnação/deposição, e foram usados os compostos bioativos originários do oleorresina (*Copaifera sp.*) e do extrato das folhas da *Copaifera luetzelburgii*, que foram impregnado/depositados pelo método clássico de imersão em solvente orgânico, o diclorometano. O método operando na isoterma de 35 °C foi capaz de impregnar 11 mg de oleorresina e 19 mg de extrato de folha por mg de biopolímero. Os compostos bioativos dessas matérias médicas, extrato de folha e oleorresina, foram capazes de inibir o crescimento bacteriano frente a cepas de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, com valores de 4 mg e 8 mg respectivamente. As microimagens dos curativos, impregnados/depositados com extrato de folhas e oleorresina, mostraram que as condições operacionais do processo clássico preservaram a organização espacial, tipo espuma, com estrutura porosa, do curativo comercial. Assim, é promissora a preservação da função de suporte de matriz extracelular que possui o curativo SpongostanTM. Diante do aumento do número de compostos bioativos do extrato das folhas e do oleorresina de copaíba, foi necessário expandir o uso das técnicas espectroscópicas, para auxiliar no controle e monitoramento dos terpenos. A combinação de técnicas de RMN e FTIR foram viáveis para a confirmação espectroscópica dos terpenos majoritários do extrato da folha e do oleorresina impregnado/depositados no curativo comercial.

Os curativos comerciais SpongostanTM e Promogran[®] foram impregnado/depositados com substâncias bioativas por diferentes processos. Apesar dos métodos terem sido realizados em diferentes condições operacionais, de massa inicial do bioativo e temperatura, é possível fazer comparações entre os processos. No trabalho fica explícito a viabilidade técnica de ambos os métodos utilizados, o SSI/SSD e a imersão, para impregnar/depositar terpenos oriundos de copaíbas nos biomateriais estudados. Nos processos, foram possíveis identificar a afinidade química dos compostos da copaíba com os diferentes solventes, scCO₂ e diclorometano, e os materiais dos curativos biopoliméricos. Além disso, as condições operacionais dos dois processos de impregnação/deposição preservaram a estrutura polimérica dos curativos. O SSI/SSD apresentou algumas vantagens em relação ao método clássico, entre elas: a seletividade dos compostos bioativos impregnado/depositados através dos ajustes da pressão operacional; e os curativos impregnado/depositados/depositados, secos e esterilizados depois da etapa final de despressurização do processo, sem exigir assim a etapa de secagem. Além disso, o SSI/SSD pode minimizar os impactos ambientais de acordo com as suas instalações operacionais, pois o solvente supercrítico pode ser recuperado e reutilizado em novos processos.

Portanto, conclui-se que a impregnação/deposição de curativos biopoliméricos com compostos bioativos de copaíba pode ser realizada por dois diferentes métodos de impregnação/deposição, para o tratamento e cicatrização de feridas. No entanto, por serem classificados como “*combination product*”, torna-se necessário avançar as investigações buscando atender aos testes e etapas exigidos pelas instituições regulamentadoras brasileira (ANVISA) e internacionais para produção e comercialização desse tipo de produto.

Sugestões para Trabalhos Futuros

O método SSI/SSD se mostrou promissor, porém requer ainda o esclarecimento de alguns pontos, que podem favorecer o desenvolvimento dessa tecnologia. Assim, como continuidade deste trabalho, sugere-se realizar ensaios de sorção do scCO₂ no biopolímero SpongostanTM na busca de parâmetros ótimos de processo. Sugere-se ainda, fazer ensaios usando o método SSI/SSD de impregnação/deposição do extrato hexânico, das folhas de copaíba, com os curativos biopoliméricos usados nesse trabalho. Pensando sobre a necessidade de se trabalhar com material vegetal (oleorresina ou extrato de folha) com alto grau de pureza, este trabalho sugere ainda estudar a impregnação/deposição supercrítica utilizando-se duas células. Na primeira célula, o scCO₂ solubilizaria os bioativos do oleorresina de copaíba, e na sequência o fluido incorporador (scCO₂ + oleorresina) seria direcionado para uma segunda célula, onde ocorreria a impregnação/deposição do oleorresina nos biopolímeros. Além disso, é interessante fazer o estudo para aumentar (*scale up*) ou diminuir (*scale down*) a escala do método SSI/SSD para processos contínuos ou descontínuos. Outros estudos relevantes para o avanços desse trabalho, são os ensaios biológicos *in vitro*, dos curativos impregnados/depositados com extrato de folha e oleorresina de copaíba, a fim de observar a atividade anti-inflamatória. A depender dos resultados, testes *in vivo* (modelo animal) para curativos tipo espuma também podem ser realizados, para determinar a eficácia dos curativos. Havendo sucesso nos resultados dos testes *in vivo*, sugerem-se os ensaios clínicos com os curativos a base de copaíba.

Este trabalho de tese, que foi realizado com materiais termosensíveis, sugere ainda a investigação do processamento de impregnação/deposição de bioativos em matrizes biopoliméricas em condições de pressão e temperatura em que o solvente CO₂ esteja na forma líquida, buscando observar os efeitos causados nos biopolímeros e a influência na capacidade

de impregnação/deposição dos bioativos na matriz e seu poder de solubilizar os bioativos de interesse.

Esse trabalho testou e comparou dois métodos de impregnação/deposição para compostos bioativos em base biopolimérica, sendo um estudo experimental de caráter exploratório. O método por imersão em diclorometano não apresenta em si novidades, ou seja, foi utilizado apenas de base de comparação com o método SSI/SSD. Dessa maneira outros compostos bioativos, outros solventes e outros curativos biopoliméricos podem ser testados para o método SSI/SSD, destacando os de estrutura sólida porosa, tipo espuma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2011. **Manual de registro e cadastramento de materiais de uso em saúde**. Brasília, p. 1 – 306, 2011.

ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p. 2227 –2236, 2010.

ALVES, I. M., ABREU, L. S., COSTA, C. O. S., LE HYARIC, M., LENISE, M., GUEDES, S., SOARES, M. B. P., BEZERRA, D. P., & VELOZO, E. S. Pyranochromones from *Dictyoloma vandellianum* A. JUSS and Their Cytotoxic Evaluation. *Chemistry & Biodiversity*, 14, 1–5, 2017.

AMERI, A.; SODEIFIAN, G.; SAJADIAN, S.A. Lansoprazole loading of polymers by supercritical carbon dioxide impregnation: Impacts of process parameters. *Journal of Supercritical Fluids*; v.164, p.1–19, 2020.

ANDERS, J. O.; MOLLENHAUER, J.; BEBERHOLD, A.; KINNE, R. W.; VENBROCKS, R. A. Gelatin-based haemostyptic Spongostan as a possible three-dimensional scaffold for a chondrocyte matrix? *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 91-B, n. 3, p. 409 – 416, 2009.

AREDO, V.; PASSALACQUA, E. S.; PRATAVIEIRA, S.; DE OLIVEIRA, A. L. Formation of lycopene-loaded hydrolysed collagen particles by supercritical impregnation. *Lwt -Food Science and Technology*, v. 110, p. 158–167, 2019.

ATKINS, P.W. **Físico-Química**; vol. 1, 8ª ed. LTC Editora, 2008.

AZEVEDO, A. B. A.; KIECKBUSH, T. G.; TASHIMA, A.K.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P.; VIEIRA DE MELO, S. A. B. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids*, v. 44, p.186 – 192, 2008.

BARBOSA, P. C. S.; WIEDEMANN, L. S. M.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chemistry & Biodiversity*, v. 10, p. 1350 – 1360, 2013.

Referências Bibliográficas

BARDAJÍ, D. K. R.; SILVA, J. J. M.; BIANCHI, T. C.; EUGÊNIO, D. S.; OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO L. F.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANNI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe*, v. 40, p. 18 – 27, 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. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 20, n. 4, p. 713, 1991.

BASAK, P.; ADHIKARI, B.; BANERJEE, I.; MAITI, T. K. Sustained release of antibiotic from polyurethane coated implant materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, p. S213 – S22, 2009.

BASTANTE, C. C.; CARDOSO, L. C.; SERRANO, C. M.; DE LA OSSA, E.J. M. Supercritical Impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties. *Journal Supercritical Fluids*, v. 128, p. 200-207, 2017.

BATISTA, A. G.; FERRARI, A. S.; CUNHA, D. C.; SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; CORREA, L. C.; PRADO, M. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; ESTEVES, E. A.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffi* fruit. *Food Chemistry*, v. 197, p. 1153 – 1159, 2016.

BERENS, A. R.; HUWARD, G. S.; KORSMEYER, R. W. Process for incorporating an additive into a polymer and product produced thereby. **US4820752**, Unites States – U.S., 1989.

BIANUCCI, A.; IMBRIANI, M.; DEL CORSO, S.; BORGHINI, A. P. D. Composition comprising a *Chelidonium majus* extract and copaiba, and the use thereof for the treatment of cutaneous dysfunctions. **WO2013084163(A1)**, WorldWide - WO, dezembro 30 2010.

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*, v. 97, p. 2892 – 2923, 2008.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 1 – 28, 2015.

BONAN, R. F.; BONAN, P. R. F.; BATISTA, A. U. D.; SAMPAIO, F. C.; ALBUQUERQUE, A. J. R.; MARIA C.B. MORAES, M. C. B.; LUIZ H.C.MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G. M.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera sp.*) oil. *Materials Science and Engineering C*, v. 48, p. 372 – 377, 2015.

Referências Bibliográficas

BOTELHO, J. R. S.; SANTOS, A. G.; ARAÚJO, M. E.; BRAGA, M. E. M.; LEAL, W. G. JUNIOR, R. N. C.; MEIRELES, M. A. A. Copaíba (*Copaifera sp.*) leaf extracts obtained by CO₂ supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 98, p. 167 – 171, 2015.

BRAGA, M. E. M., EHLERT, P. A. D., MING, L. C., MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 149 – 156, 2005.

BRAGA, M. E. M.; MATOS, M. B. C.; DIAS, A. M. A.; SOUSA, H. C. Em: **Desenvolvimento de aplicações farmacêuticas e biomédicas através de métodos de impregnação/deposição com fluido supercrítico**. H. C. Sousa, M. E. M. Braga, A. Sosnik, (Eds). Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados. Universidade de Coimbra, 2015, p. 309 – 383.

BRAGA, M. E. M.; PATO, M. T. V. P.; COSTA SILVA, H. S. R.; FERREIRA, E. I.; GIL, M. H.; DUARTE, C. M. M.; SOUSA, H. C. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 44, p. 245 – 257, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 185 de 22 de outubro de 2001. **Regulamento Técnico do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2001.

BRASIL. **Manual de condutas para tratamento de úlceras em hanseníase e diabetes**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acessado em: 19/11/2016.

BUENO, C.Z.; MORAES, A.M.; SOUSA, H.C.; BRAGA, M.E.M. Effects of supercritical carbon dioxide processing on the properties of chitosan–alginate membranes. *Journal of Supercritical Fluids* v. 112, p. 128–135, 2016.

CABEZA, A.; SOBRÓN, F.; GARCÍA-SERNA, J. COCERO, M. J. Simulation of the supercritical CO₂ extraction from natural matrices in packed bed columns: User-friendly simulator tool using Excel. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 116, p. 198 – 208, 2016.

Referências Bibliográficas

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CAMPOS, A. C., BORGES-BRANCO, A., & GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. *ABCD Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva*, v. 20(1), p. 51–58, 2007.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. *Química Nova*, v.24 (4), p. 509-515, 2001.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* v. 18, n. 2, p. 314 – 319, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; BASTOS J. K.; BRUNHAROTO L. P. F.; BRUNHAROTO J.R. C.; BRUNHAROTO A. R. Process to obtain extracts, fractions and isolated compounds from *Copaifera* species and their use for the treatment of urinary lithiasis in human beings and animals. **WO2005110446 (A1)**, World Wide – WO, april 22 2004.

CASTRILLO, A.; HERAS, B.; HORTELANO, S.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; BOSCA, L. Inhibition of the nuclear Factor κ B (NF- κ B) pathway by Tetracyclic Kaurene Diterpenes in macrophages. *Journal Biologic Chemical*, v. 276 (19), p. 15854-15860, 2001.

CHAMPEAU, M., COUTINHO, I. T., THOMASSIN, J. M., TASSAING, T. & JÉRÔME, C. Tuning the release profile of ketoprofen from poly(L-lactic acid) suture using supercritical CO₂ impregnation process. *Journal Drug Deliv. Sci. Technol.* v. 55, p. 101468, 2020.

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

COSTA, A. R. M.; FREITAS, L. A. P.; MENDIOLA, J.; IBANEZ, E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 100, p. 86 – 96, 2015.

COSTA, J. A. S.; QUEIROZ, L. P. *Copaifera sabulicola (leguminosae)*, uma nova espécie do cerrado brasileiro. *Rodriguésia*, v.58 (2), p. 393 – 396, 2007.

Referências Bibliográficas

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. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 52 p. 306 – 316, 2010.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. Second ed. Oxford: Clarendon Press, 1975.

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. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 408, p. 9 – 19, 2011.

DIAS, A.M.A.; REY-RICO, A.; OLIVEIRA, R.A.; MARCENEIRO, S.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, 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. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 74, p. 34 – 45, 2013.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 4 – 29, 2016.

EMA, **European Medical Agency** (2016). ICH Q3C Guideline, Impurities: Residual solvents. Disponível: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/03/WC500104258.pdf. Acessado em: 12/12/2016.

ESTEVIÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R. S.; MENDOÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 28 (12), p. 863 – 869, 2013.

EUCAST, **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing** (2017). "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 5.0, 2015, p. 17 – 21, 2017. Disponível em: http://www.eucast.org.Disk_diffusion. Acessado em 03/06/2016.

FERRARI, M.; PAGNONI, U.M.; PELIZZO NI, F.; LUKES, V.; FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. *Phytochemistry*, v.10, p. 905, 1971.

FDA. Food Drug Administration. **Everything Added to Food in the United States** Disponível: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=esfuslisti ng&id=2407>. Acessado em 03/07/2017.

GARCÍA-CASAS, I.; CRAMPON, C.; MONTES, A.; PEREYRA, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.J.; BADENS, E. Supercritical CO₂ impregnation of silica microparticles with quercetin. *Journal Supercritical Fluids*, v. 143, p. 157–161, 2019.

GELMINIA, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic Effect. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 440, p. 170 – 178, 2013.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE X. Q.; ALTMANN, K. H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105 (26), p. 9099-104, doi: 10.1073/pnas.0803601105, 2008.

GONI, M. L.; GANAN, N. A.; BARBOSA, S. E.; STRUMIA, M. C.; MARTINI, R. e: Supercritical CO₂-assisted impregnation of LDPE/sepiolite nanocomposite films with insecticidal terpene ketones: impregnation yield, crystallinity and mechanical properties assessment. *Journal Supercritical Fluids*, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.supflu.2017.06.013>

GOYAL, R.; MACRI, L. K.; KAPLAN, H. M.; KOHN, J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 28, p. 77 – 92, 2015.

GRODOWSKA, K.; PARCZEWSKI, A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v. 67, (1), p. 3 – 12, 2010.

HENDRIKS, J. G. E.; VAN HORN, J. R.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Background of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials*, v. 25, p. 545 – 556, 2004.

HOMAEIGO HAR, S., & BOCCACCINI, A. R. Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. *Acta Biomaterialia*. v. 107; p. 25 – 49, 2020.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA)**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2015>. Acessado em 19/07/2017.

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. **Consulta à Base de Dados do INPI**. Relação de patentes depositadas e concedidas. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>. Acessado em 27 julho, 2017.

JESPERSEN, H. T. **Study of sorption and modification of polymer films in supercritical carbon dioxide - Sorption, desorption and metal impregnation.** [s.l.] University of Copenhagen, 2002.

JUSTITLE, A. Balsam of Copaiba. *The Lancet*, v. 12 (303), p. 384, 1829.

KLANGJORHOR, J.; NIMKINGRATANA, P.; SETTAKORN, J.; RUKSAKORN, D.; LEERAPUN, T.; ARPORNCHAYANON, O.; ROJANASTHIEN, S.; KONGTAWELERT, P.; POTHACHAROEN, P. Hyaluronan production and chondrogenic properties of primary human chondrocyte on gelatin based hemostatic Spongostan scaffold. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, v. 7, (40), p. 1 – 8, 2012.

KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. *Current opinion in Solid State and Material Science*, v. 7, p. 399 – 405, 2003.

KOONRUNGSESOMBOON, N.; KARBWANG, J. Ethical considerations in clinical research on herbal medicine for prevention of cardiovascular disease in the ageing. *Phytomedicine*, v. 23, p. 1090 – 1094, 2016.

LANGER, R. Biomaterials and biotechnology: From the discovery of the first angiogenesis inhibitors to the development of controlled drug delivery systems and the foundation of tissue engineering. *Journal Biomedical Materials Research A*, v. 101, p. 2449 – 2455, 2013.

LEMO, M.; SANTIN, J. R.; MIZUNO, C. S.; BOEING, T.; SOUSA, J. P. B.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffi*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 238 – 245, 2015.

LI, W. B., SEGRÈ, P. N., GAMMON, R. W., SENGERS, J. V., & LAMVIK, M. Determination of the temperature and concentration dependence of the refractive index of a liquid mixture. *The Journal of Chemical Physics*, v. 101(6), p. 5058–5069, 1994.

LIMA, S. R. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 1048 – 1053, 2003.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrofílicos. *Rev Bras Ciências Farm J Pharm Sci*, v.41(2), p.143 – 154, 2005.

Referências Bibliográficas

LUCCA, L. G.; MATOS, S. P.; BORILLE, B. T.; DIAS, D. O.; TEXEIRA, H. F. VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 104, p. 144 – 148, 2015.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; KAPLAN, M. A. C. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28 (4), p. 833 – 838, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p.429 – 38, 2002.

MACIEL, M. A. M.; MEDEIROS, M. L. M.; FILHO, I. A.; SALGUEIRO, C. C. M.; ROSSI/SSD, C. G. F. T.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Nanoformulação contendo bioativos naturais para cicatrização de lesões cutâneas. **BR 102014033133-6 A2**. Brasil, 2014.

MARAGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; LEITE, P. M. F.; SANTOS, D. A.; NITSCHKE, M.; PLEPI, A. M. G. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Materials Science and Engineering C*, v.48, p. 372–377, 2015.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; SILVA, A. C. Plantas medicinais da RENISUS com potencial anti-inflamatório: revisão sistemática em três bases de dados científicas. *Revista Fitos*, v. 9 (2), p.73 – 159, 2015.

MARQUES, M. M.; COUTO, R. S. A. Biomateriais de reparação tecidual e usos dos biomateriais de reparação tecidual. **BR 10 2015 015484 4 A2**, Brasil, 10 de Outubro de 2013.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, v. 36, p. 1248 – 1255 , 2013.

MASCHIETTI, M. High-pressure gas–liquid equilibrium of the system carbon dioxide–*Caryophyllene* at 50 and 70 °C. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 59, p. 8 – 13, 2011.

MEYER, C.; KREFT, H.; GURALNICK, R.; JETZ, W. Global priorities for an effective information basis of biodiversity distributions. *Nature Communications*, 6:8221, doi: 10.1038/ncomms9221, 2015.

MICHIELIN, E. M. Z.; ROSSO, S. R.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G. R.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. High-pressure phase equilibrium

data for systems with carbon dioxide, α -humulene and *trans*-caryophyllene. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 41, p. 130–137, 2009.

MORELLI, C. L.; MAHROUS, M.; BELGACEM, M. N.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R.E.S.; BRAS, J. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. *Industrial Crops and Products*, v. 70, p. 134–141, 2015.

MOHSEN-NIA, M., JAZI, B., & AMIRI, H. Binodal curve measurements for (water + propionic acid + dichloromethane) ternary system by cloud point method. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 41(7), p. 859–863, 2009.

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 Biomaterialia*, v. 9, p. 7093–7114, 2013.

MUTHUKUMAR, T.; PRABU, P.; GHOSH, K.; SASTRY, T. P. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 113, 207–212, 2014.

MUSTAPA, A.N.; MARTIN, A.; SANZ-MORAL, L.M.; RUEDA, M.; COCERO, M.J. Impregnation of medicinal plant phytochemical compounds into silica and alginate aerogels. *Journal Supercritical Fluids*, v. 116, p. 251–63, 2016.

NASCIMENTO, M. E.; ZOGHBI, M. G. B.; PINTO, J. E. B. P. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 43, p. 1-6, 2012.

NEWTON, P.; WATKINSON, A. R.; PERES C. A. Determinants of yield in a non-timber forest product: *Copaifera* oleoresin in Amazonian extractive reserves. *Forest Ecology and Management*, v. 261, p. 255–264, 2011.

NOGUEIRA, M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K. Flavonoids and methoxy-galloylquinic acid derivatives from the leaf extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 63, p. 6939–6945, 2015.

Referências Bibliográficas

OPAS, Organização Pan-Americana de Saúde. 2017. “OMS Publica Lista de Bactérias Para as Quais Se Necessitam Novos Antibióticos Urgentemente.” OPAS. Disponível: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812, acessado em 10/08/20.

PAIVA, L. A. F.; CUNHA, K. M. A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research*, v. 16, 737 – 739, 2002.

PAINTER, P. C.; COLLEMAN, M. M. **Essentials of Polymer Science and Engineering**. Lancaster, Pennsylvania: DEStech Publications, Inc., 2009.

PERMAN, C. A.; RIECHERT, M. E. Methods of polymer impregnation **US5340614**, Unites States – U. S., 1994.

PIRES, A. G. V.; AOUADA, M. R. M. Filmes poliméricos de alginato de sódio impregnado/depositados com óleos essenciais para aplicação como curativo. *Química Nova*, v. 40 (01), p. 1 – 5, 2017.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 146 – 166, 2006.

ROSA, A. B. S. **PCL/SBA-15 composite biomaterials plasticized with greener additives**. 2013. Master degree thesis (Pos-Bolonha) - Department of Chemical Engineering – FCT – University of Coimbra, 2013.

ROSA, A. B. S.; MARCENEIRO, S.; BRAGA, M. E. M.; DIAS, A. M. A.; SOUSA, H. C. S. Solubility of *all-trans* retinoic acid in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 98, p. 70 – 78, 2015.

ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 235 – 240, 2005.

SANCHEZ, J. S.; PONCE, M.T. F.; CASAS, L.; MANTELL, C.; DE LA OSSA E.J. M. Impregnation of mango leaf extract into a polyester textile using supercritical carbon dioxide. *Journal Supercritical Fluids*, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.supflu.2017.05.033>.

SAND, M.L. Method for impregnating a thermoplastic polymer. **US4598006**, Unites States – U. S., 1986.

Referências Bibliográficas

SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; ANDRADE, B. F. M. T.; SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. L. G.; CREVELIN, E. J.; MORAES, A. B.; VENEZIANI, R.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory action of *Copaifera ssp* oleoresins on cytokine production by human monocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 70, p. 12 – 18, 2015.

SANTOS, A. O.; IZUMI, E.; NAKAMURA, T. U.; DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaíba oil. *Memory Institute Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 59 – 64, 2013.

SANTOS, A. O.; NAKAMURAB, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTOD, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, p. 204 – 208, 2008.

SANTOS, R. C.; ESPÍRITO-SANTO, R. F.; ABREU, L. S., OLIVEIRA, A. L.; FONTES, L. D.; TAVARES, F. J.; SILVA, M. S.; SOARES, M. B. P.; VELOZO, E. S.; VILLARREAL, C. F. Fluorescent Canthin-6-one Alkaloids from *Simaba bahiensis*: Isolation, Identification, and Cell-Labeling Properties. *ChemPlusChem*, v. 84, p. 260 – 267, 2019.

SARQUIS, R. S. F. R.; SARQUIS, I. R.; SARQUIS, I. R.; FERNANDES, C. P.; SILVA, G. A. SILVA, R. B. L.; JARDIM, M. A. G. SANCHEZ-ORTIZ, B. L.; CARVALHO, J. C. T. The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. *Evid Based Complement Alternat Med*, p. 1-6, 10, 2019.

SCHIERHOLZ, J. M.; STEINHAUSER, H.; RUMPS, A.F.E.; BERKELS, R.; PULVERER, G. Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: morphological and structural features. *Biomaterials*, v. 18, p. 839 – 844, 1997.

SCHMITZ, M.; EBERLIN, T.; ANDRIESSEN, A. Wound treatment costs comparing a bio-cellulose dressing with moist wound healing dressing and conventional dressings. *Wound Medicine*, v. 6, p. 11-14, 2014.

SCHULZE, Z. W. E.; SCHEUNEMANNV, D. R. Hair treatment agent useful e.g. for preventing or reducing dandruff, comprises *Copaifera officinalis* oil, *bertholletiaexcelsa* nut oil, and an anti-dandruff active ingredient. **DE102010063791 (A1)**, Germany, dezember 21 2010.

SILVA, A. A. B.; BASTOS, J. K.; BRUNHAROTO, A. R. F. Method for preparing matrix micro-particles of *Copaifera langsdorffii* (aerial parts) and for isolating the active principles therein. **WO2011120118 (A1)**, Worldwide - WO, march 30 2010.

Referências Bibliográficas

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

SILVA, C. V. d., PEREIRA, V. J., COSTA, G. M. N., CABRAL-ALBURQUEQUE, E. C. M., MELO, S. A. B., SOUSA, H. C., DIAS, A. M. A., & BRAGA, M. E. M. Supercritical solvent impregnation of spilanthol-enriched extracts into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 133(1), p. 503–511, 2018.

SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOSO, E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de *Rutaceae* do Nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20 (3) p. 355 – 360, 2010.

SIMÕES, C. A. C. G. Método de fabricação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) com atividade antibacteriana para controle de placa ou biofilme dental. **PI0404266-2A**, Brasil, 24 de setembro, 2004.

SOARES, D. C.; PORTELLA, N. A.; RAMOS, M. F.; SIANI, A. C.; SARAIVA, E. M. Trans-β-caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera ssp.*). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1 – 13, 2013.

SOUSA, H.C.; GIL, M.H.M.; LEITE, E.O.B.; DUARTE, C.M.M.; DUARTE, A.R.C. Method for preparing sustained-release therapeutic ophthalmic articles using compressed fluids for impregnation of drugs. **EP1611877**, Espanha, 2006.

SOUSA, H. C.; GIL, M. H. M.; LEITE, E.O.B.; DUARTE, C. M. M.; DUARTE, A. R. C. Method for preparing therapeutic ophthalmic articles using compressed fluids **US20060008506 (A1)**, Unites States – U.S., jan 12 2006.

STEEGE, H. T.; VAESSEN, R. W.; CÁRDENAS-LÓPEZ, D.; SABATIER, D.; ANTONELLI, A.; OLIVEIRA, S. M.; PITMAN, N. C. A.; JØRGENSEN, P. M.; SALOMÃO, R. P. The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. *Scientific Reports*, v. 6, 29549; doi: 10.1038/srep29549, 2016.

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. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 93, p. 91 – 102, 2014.

TOBOUTI, P. L., DE ANDRADE MARTINS, T. C., PEREIRA, T. J., & MUSSI/SSD, M. C. M. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 94, p. 93–99, 2017.

TRINDADE, F. T. T., STABELI, R. G., PEREIRA, A. A., FACUNDO, V. A., & SILVA, A. DE A. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oil-resin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23(3), p. 464–470, 2013.

UHRICH, K. E.; CANIZZARO, S. M.; LANGER, R. S.; SHAKESFF, K. M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 3181 – 3198, 1999.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. *Química Nova*, v. 25 (2), p. 273 – 286, 2002.

_____. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28 (3), p. 519 – 528, 2005.

_____. Constituintes Químicos das Cascas Constituintes Químicos das Cascas de *Copaifera langsdorfii* Desf. *Revista Fitos*, v. 2 (1), p. 59 – 64, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, p. 248 – 254, 2007.

VIEIRA DE MELO, S. A. B.; COSTA, G. M. N, VIANA, A. C. C.; PESSOA, F. L. P. Solid pure component property effects on modeling upper crossover pressure for supercritical fluid process synthesis: A case study for the separation of Annatto pigments using SC-CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, p. 1 – 8, 2009.

VITERBO, F. C.; LIMA, F. F. S.; OLIVERA B. G. R. B. Tratamento tópico com ácido graxo essencial (AGE'S), associado à copaíba e a melaleuca em clientes diabéticos portadores lesões cutâneas – **Estudo de caso**. 2001.

Referências Bibliográficas

WAGNER, H., KOSTKA, K.H., LEHR, C.M., SCHAEFER, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal Control Release*, v. 75, p. 283 – 295, 2001.

WOOD, H. C.; LAWALL, C. H.; YOUNGKEN, H. W.; OSOL, A.; GRIFFITH, I.; GERSHENFELD, L. **The dispensatory of the United States of America**. J. B. Lippincott Company: London, 22^a ed., p. 369, 1940.

WU, K.; CHEN, Y. C.; HSU, Y. M.; CHANG, C. H. Enhancing drug release from antibiotic-loaded bone cement using porogens. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, v. 24, p. 188 – 195, 2016.

WU, W. QIANG, PENG, S., SONG, Z. YUAN, & LIN, S. Collagen biomaterial for the treatment of myocardial infarction: an update on cardiac tissue engineering and myocardial regeneration. *Drug Delivery and Translational Research*, 9(5), 920–934, 2019.

XAVIER-JUNIOR, F. H.; EGITO, E. S. T.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. N.; MACIUK, A.; VAUTHIER, C. Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaíba oil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.055>, 2017.

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*, v. 21(11), p.1296– 1302 , 2013.

YUDANOVA, T.N.; RESHETOV, I.V. Drug synthesis methods and manufacturing technology modern wound dressings: manufacturing and properties, *Journal Pharmaceutical Chemical*, v. 40, p. 85 – 92, 2006.

ZAMAN, H.U.; ISLAM, J.M.M.; KHAN, M.A.; KHAN, R.A. Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 4, p. 1369 – 1375, 2011.

ZANG, J.; ONAKPOYA, I. J.; POSADZKI, P.; EDDOUKS, M. The Safety of Herbal Medicine: From Prejudice to Evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, Article ID 316706, p. 1 – 3, 2015.

APÊNDICE

Lista de Publicações

PASCOAL, D. R. C.; VELOSO, E. S.; SOUSA, H. C.; BRAGA, M. E. M.; ALBUQUERQUE, E. C. M. C.; VIEIRA DE MELO, S. A. B. Bioactives Compounds of *Copaifera sp.* Impregnated into Three-Dimensional Gelatin Dressings. *Drug Delivery and Translational* (2020) <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00797-2>.

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 antileishmanial treatment. *Journal of Supercritical Fluids*. v.129, p.106 - 115, 2017.

PASCOAL, D. R. C.; ALBUQUERQUE, E. C. M. C.; VELOSO, E. S.; 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 Antileishmanial Treatment. 16th European Meeting on Supercritical Fluids (EMSF), Lisbon, Portugal, April 25-28, 2017. (Poster).

PASCOAL, D.R.C.; ALBUQUERQUE, E. C. M. C.; VELOSO, E. S.; SOUSA, H. C.; VIEIRA DE MELO, S. A. B.; BRAGA, M. E. M. Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂. IV Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids – PROSCIBA, 2016. (Poster)

SILVA, M. P.; PEREIRA, V. J.; PASCOAL, D. R. C.; COSTA, G. M. N.; ALBUQUERQUE, E. C. M. C.; VIEIRA DE MELO, S. A. B., Modelagem do processo de carreamento do óleo de copaíba em curativos comerciais utilizando CO₂ supercrítico. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016. (Poster)

ANEXOS

Figura 29. Classificação dos principais solventes orgânicos utilizados nas indústrias. Fonte: Adaptado de GRODOWSKA; PARCZEWSKI, 2010

Solventes Classe 1	Limite de concentração (ppm)	Perigo
Benzeno	2	Carcinógeno
Tetracloroto de carbono	4	Tóxico e ambiental
1,2-Dicloroetano	5	Tóxico
1,1-Dicloroetano	8	Tóxico
1,1,1- Tricloroetano	1500	Ambiental
Solventes Classe 2	Limite de exposição diária admissível (mg/dia)	Limite de concentração (ppm)
Acetonitrilo	4,1	410
Clorobenzeno	3,6	360
Clorofórmio	0,6	60
Ciclohexano	38,8	3880
1,2-Dicloroetano	18,7	1870
Diclorometano	6,0	600
1,2-Dimetoxietano	1,0	100
N, N-dimetilacetamida	10,9	1090
N, N-dimetilformamida	8,8	880
1,4-Dioxano	3,8	380
2-Etoxietanol	1,6	160
Etilenoglicol	6,2	620
Formamida	2,2	220
Hexano	2,9	290
Metanol	20,0	2000
2-metoxietanol	0,5	50
Metilbutilcetona	0,5	50
Metilciclohexano	11,8	1180
N-metil-pirrolidona	48,4	4840
Nitrometano	0,5	50
Piridina	2,0	200
Sulfolane	1,6	160
Tetralina	1,0	100
Tolueno	8,9	890
1,1,2-Tricloroetileno	0,8	80
Xileno	2,0	2170

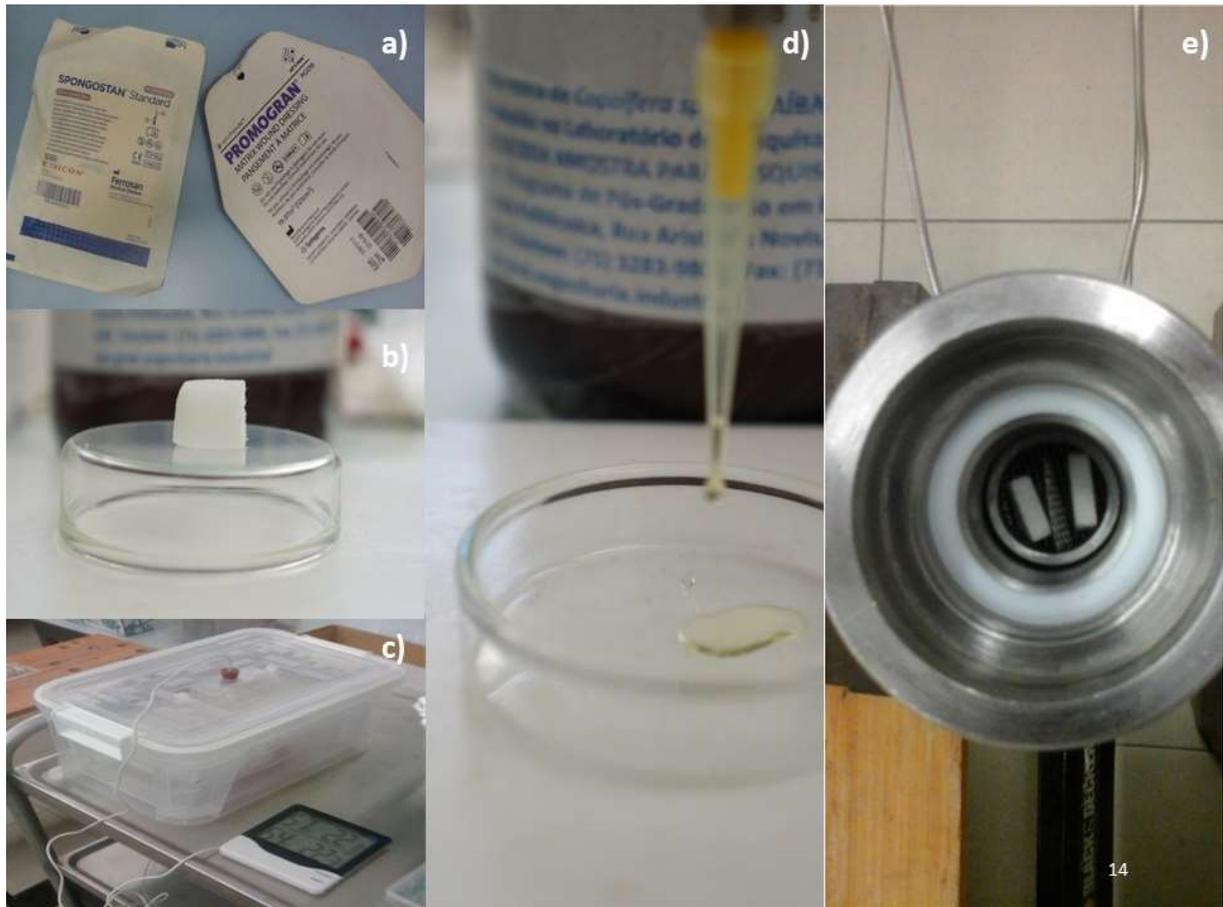


Figura 30. Montagem da célula de impregnação do SSI/SSD, onde mostra em (a) os curativos biopoliméricos comerciais; (b) amostra de 1 cm² do curativo; (c) amostras expostas a UR de 20 % por 24 horas; (d) adição do oleorresina; (e) célula de aço inox de impregnação onde o biopolímero esta na parte superior e o oleorresina na parte inferior. Logo após a célula de impregnação foi colocada em banho termostático.

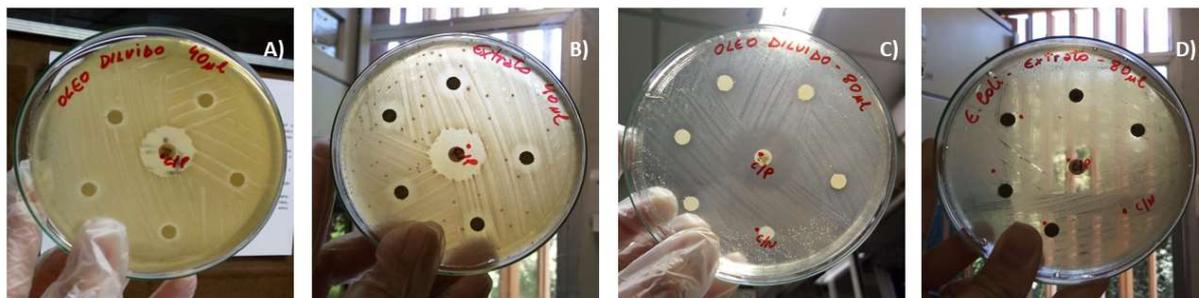


Figura 31. Atividade antimicrobiana da oleorresina e do extrato das folhas de copaíba apresentando os halos de inibição do crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro (mm), frente aos microrganismos *S. aureus* e *E. coli*. Em (A) mostra o resultado do halo de inibição usando 4 mg de oleorresina, em (B) mostra o halo de inibição de 4 mg de extrato da folha, ambos contra as cepas de *S. aureus*. Enquanto em (C) mostra o halo de inibição de 8 mg de oleorresina e em (D) o halo de inibição de 8 mg de extrato de folhas, ambos contra a *E. coli*. Os valores dos halos são apresentados na Tabela 4



Figura 32. Sistema de impregnação/deposição usando fluido supercrítico (SSI/SSD), formado por um manômetro digital (1), termostato digital (2), célula de impregnação/deposição (aço inoxidável) para processos de alta pressão dentro de banho termostático de ar (3), agitador magnético (4), válvulas de alta pressão de agulha de precisão (5) e válvula micrométrica (6)

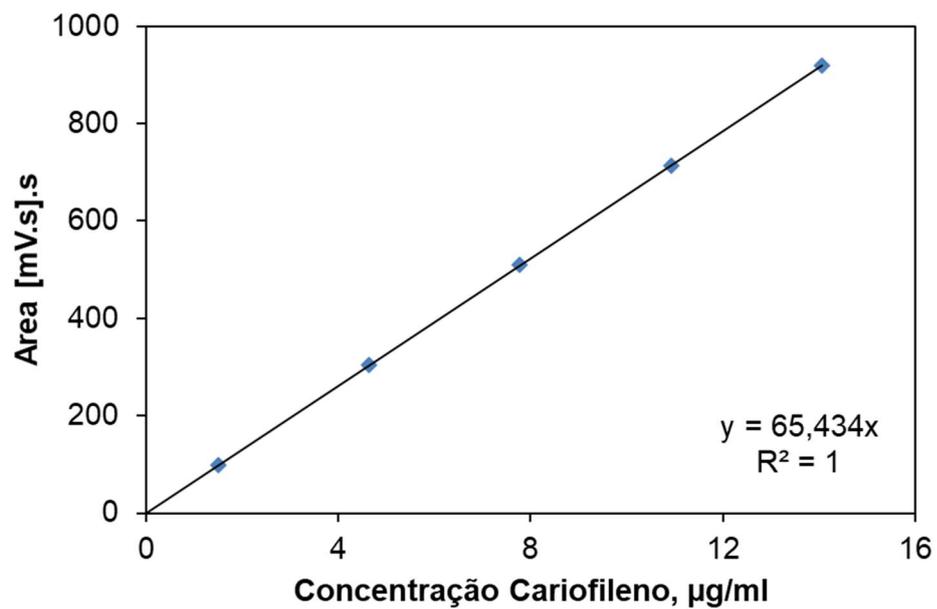


Figura 33. Curva de calibração do β -Cariofileno pelo método de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

Anexos

Tabela 9 – Exemplos de trabalhos publicados sobre de incorporação de produtos naturais em matrizes poliméricas, utilizando métodos clássicos e o SSI/SSD.

Produto natural	Método	Material	Polímero	Pressão (MPa)	Temperatura de processo (°C)	Taxa de despressurização (MPa/min)	Tempo (h)	Massa incorporada no polímero	Tempo de secagem (h)/temperatura (°C)	Referência
óleo de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	Casting	ácido acético/etanol	quitosana	0,1	ND	NA	ND	1 % (v/v)	29/40	Altioek et al., 2010
óleos essenciais de copaíba (Copaifera), Melaleuca e limão (<i>Citrus limonum</i>)	Casting	Twee 80/água	alginato	0,1	ND	NA	ND	2 e 3 % (m/v)	24/30 e 45	Pires et al., 2016
extrato de folha de macrotíloma (<i>Macrotyloma uniflorum</i>)	Reação química de reticulação	ácidos acético/ glutaraldeído/TritonX-100	colágeno de peixe	0,1	80	NA	ND	1 % (m/v)	NA/40	Muthukumar et al., 2014
extrato de folha de justiça vermelha (<i>Clinacanthus nutans</i>)	Imersão	etanol	alginato	0,1	4	12	72	10 e 19 % (m/m)	40	Mustapa et al., 2016
oleorresina de copaíba (Copaifera)	Mistura física	óleo mineral	NA	0,1	ND	NA	ND	50 % (v/v)	NA	Vieira et al., 2008
oleorresina de copaíba (Copaifera)	Casting	clorofórmio	poli-ácido láctico	0,1	25	NA	2	1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 % (m/m)	ND/ambiente	Morelli et al., 2015
Oleorresina de copaíba (Copaifera)	Imersão	nenhum	celulose	0,1	25	NA	1	17 % (m/m)	96/25	Morelli et al., 2015
oleorresina de copaíba (Copaifera)	Coating	nenhum	celulose	0,1	25	NA	ND	19 % (m/m)	96/25	Morelli et al., 2015
oleorresina de copaíba (Copaifera)	Coating	nenhum	poli-ácido láctico	0,1	25	NA	ND	14 % (m/m)	96/25	Morelli et al., 2015
oleorresina de copaíba (Copaifera)	Reação química de reticulação	dimetilsulfóxido	gelatina/ quitosana	0,1	25	NA	0,5	125 µg/mL	ND	Maragon et al., 2017
extrato das flores de jambu (<i>Spilanthes acmella</i>)	SSI/SSD	scCO2/etanol	colágeno/ celulose regenerada	9, 11 e 18	35 e 45	0,5	4	2 a 6 % (m/m)	NA	Silva et al., 2018
licopeno	SSI/SSD	scCO2	colágeno	15 e 25	50 e 60	1	0,75	84 e 94 % (eficiência na partícula)	NA	Aredo et al., 2019
extrato de folha de oliveira (<i>Olea europaea</i>)/ácido caféico	SSI/SSD	scCO2/etanol	polietileno tereftalato/ polipropileno	10, 20, 30 e 40	35 e 55	1 e 100	1	0,04 a 1 % (m/m)	NA	Bastante et al., 2017
extrato de folha de justiça vermelha (<i>Clinacanthus nutans</i>)	SSI/SSD	scCO2/etanol	alginato	15	40	0,2	24	5 e 13 % (m/m)	NA	Mustapa et al., 2016
extrato de frutas jucá (<i>Libidina ferrea</i>)	SSI/SSD	scCO2	quitosana/ colágeno e celulose regenerada/ ácido hialurônico	27	50	0,3 e 1	15	0,25 a 0,48 mg/mg	NA	Dias et al., 2013
óleo de borragem (<i>Borago officinalis</i>)	SSI/SSD	scCO2	poliuretano	9, 18 e 30	35 e 55	1	3	3 a 12 % (m/m)	NA	Silva et al., 2016

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>

