



MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMEMBRANA DE QUITOSANA E COPAÍBA PARA POTENCIAL USO EM FERIDAS

Sheila Barbosa Paranhos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia, ITEC, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Verônica Scarpini
Candido.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcele Fonseca
Passos.

BELÉM, PA - BRASIL

JUNHO DE 2022

MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMEMBRANA DE
QUITOSANA E COPAÍBA PARA POTENCIAL USO EM FERIDAS

Sheila Barbosa Paranhos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA (PRODERNA/ITEC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS.

Aprovada por:

Prof. Severino Alves Júnior, D.Sc.

Prof. Raul Nunes, de Carvalho Junior, D.Sc

Prof. Alisson Clay Rios da Silva, D.Sc.

Profa. Simone Patrícia Aranha da Paz, D.Sc.

.Profa. Marcele Fonseca Passos, D.Eng.

Profa. Verônica Scarpini Candido, D.Sc

BELÉM, PA - BRASIL

JUNHO DE 2022

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P223m Paranhos, Sheila Barbosa

Métodos de obtenção e caracterização de biomembrana de quitosana e copaíba para potencial uso em feridas / Sheila Barbosa Paranhos Paranhos. — Belém: UFPA/ PRODERNA, 2022.

164 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Verônica Scarpini Candido. Candido Coorientação: Prof^ª. Dra. Marcele Fonseca Passos.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais na Amazônia, Belém, 2022.

Referências Bibliográficas: p.109-130.

1. Biomaterial. 2. Quitosana. 3. Óleo de copaíba. 4. Cicatrização. 5. Feridas cutâneas.

I. Candido, Verônica Scarpini.

II. Universidade Federal do Pará, ITEC, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia.

DEDICATÓRIA

“ Por mais difícil que possa ser os caminhos da sabedoria, o mais importante é saber que a ciência faz a diferença para a humanidade. Dedico à ciência e aos cientistas por esses feitos e inspirações”.

AGRADECIMENTOS

Nesse ciclo concluído com êxito, a palavra que dedico à todos é gratidão. Essa longa jornada foi permeada de momentos de alegria, desânimo, superação, força de vontade, desistência, incapacidade, perseverança, otimismo, tristeza, muito aprendizado, troca de saberes e fé.

A fé em Deus foi a maneira de acreditar que a vida tem um propósito, com isso, continuar a caminhada foi possível pela força espiritual que emana, quando a sintonia, em Deus está presente.

Não tenho nem palavras para agradecer o suporte emocional que a minha família me deu nesse período de dedicação nos estudos. Às minhas filhas Fernanda e Júlia foram motivadoras para alcançar esse objetivo almejado, visto que são as verdadeiras razões de minha existência.

Ao meu esposo, Jailson, só posso dizer o quanto és importante na minha vida e de minhas filhas. Obrigada por segurar sempre em minhas mãos e navegar juntos em meus sonhos. A gravidez da Júlia em pleno doutorado foi a verdadeira prova de amor que tens por nós. Foram momentos bem delicados, mas vencemos juntos.

Agradeço à minha mãe, irmão, parentes e amigos que por muitas vezes faziam orações para que desse tudo certo nas principais etapas do doutorado. Ao meu pai Hailton (*in memoriam*), por sempre orgulhar-se de minhas vitórias.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), por me proporcionar um ensino público e de qualidade na graduação e pós-graduação. Orgulho maior ainda é fazer parte desta instituição renomada da região Amazônica como docente. Obrigada à Faculdade de Enfermagem /UFPA e aos colegas professores pelas palavras de incentivo e apoio.

À turma especial do doutorado, composta por odontólogos e enfermeiras, pelo aprendizado mútuo e pelas dificuldades compartilhadas. De modo especial aos colegas Augusto (*In memoriam*) e Carlos (*In memoriam*) que nos deixaram abruptamente no decorrer desta trajetória e não conseguiram concluir seus sonhos, mas serão inesquecíveis dado o otimismo e força de vontade durante o curso.

Muito grata à Profa. Dra. Carmem Gilda pelo acolhimento e empenho para que este doutorado fosse possível. Seus ensinamentos foram fundamentais para o entendimento da construção inicial de nossos projetos.

Às amigas que o doutorado me concedeu, sem ordem de preferência, Elisângela Ferreira, Esleane Vasconcelos e Francilene Belo, enfermeiras e professoras,

vivenciando um curso em Engenharia, um verdadeiro desafio, que juntas foi mais fácil para superarmos as limitações específicas da área. No final, tudo deu certo. Obrigada meninas pela parceria, pelos momentos de alegrias, pelas palavras de força e incentivo, por nunca terem soltado a minha mão nos momentos mais difíceis por mim vividos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia (PRODERNA/UFPA), pela oportunidade a nós concedida, como primeira turma especial, para realizarmos o doutorado na engenharia. Aos professores do referido programa que colaboraram para a aquisição de conhecimentos, principalmente à Profa. Dra. Simone Paz pela inspiração e apoio em momentos singulares.

Em especial, agradeço imensamente ao Prof. Marcos Vinícius Paula e Profa. Marcele Passos (co-orientadora), pela parceria que renderam muitas experiências exitosas. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, dedicação, apoio e palavras de incentivo. As contribuições de vocês foram valiosas e importantíssimas para o sucesso da tese.

Aos laboratórios que apoiaram incansavelmente na execução da pesquisa: Engenharia Química da UFPA/Belém, Caracterização de Materiais da UFPA/Ananindeua, Laboratórios de Química da UFPA/Ananindeua, Compostos Híbridos Interfaces e Colóides/UFPE, Caracterização de Materiais do Instituto Federal do Pará (IFPA) /Belém, Óleos da Amazônia/Parque de Ciência e Tecnologia da UFPA/Belém, Caracterização Mineral da UFPA/Belém, Física da UFPA/Belém.

Não poderia deixar de agradecer ao Jhonny, técnico do Laboratório de Química da UFPA/Ananindeua, que foi solícito em todos os momentos do experimento. À colega Miriane, pelos ensinamentos e comprometimento ético em tudo que faz. A aluna da graduação Taiana que compartilhamos boas experiências.

Finalmente, agradeço com o coração repleto de felicidades e sentimento de gratidão, à Profa. Verônica Scarpini, primeiramente por ter aceitado ser minha orientadora e, principalmente, por acreditar em mim. Tive momentos bem complicados, mas a maneira como os conduziram foram imprescindíveis para não desistir. Você é um exemplo de determinação e otimismo, que me impulsionaram a continuar na luta pelos meus sonhos e objetivos. Pode acreditar que aprendi muito com você nesse período de orientações. Se consegui chegar até aqui, foi graças ao seu planejamento, organização, prazos determinados, inteligência, expertise, estímulo, dedicação e principalmente a confiança em mim. Obrigada por tudo.

Resumo da Tese apresentada ao PRODERNA/UFPA como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Recursos Naturais.

MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMEMBRANA DE QUITOSANA E COPAÍBA PARA POTENCIAL USO EM FERIDAS

Sheila Barbosa Paranhos

Junho/2022

Orientadora: Verônica Scarpini Candido.

Co-orientadora: Marcele Fonseca dos Passos.

Área de concentração: Transformação de Recursos Naturais

Os profissionais da saúde lidam diretamente com diversas situações complexas no cuidado a pessoas adoecidas. Dentre estas, destacam-se as feridas na pele que podem trazer prejuízos na condição clínica do paciente, além de tratamentos onerosos para a cura. As feridas cutâneas exigem curativos para proteção contra microorganismos patogênicos e para acelerar o processo de cicatrização. Com o surgimento dos biomateriais disponíveis para uso no tratamento de feridas, a quitosana tornou-se uma escolha eficaz, encontrada facilmente na forma natural e renovável como potencial cicatrizante. A membrana de quitosana apresenta condições ideais no tratamento de feridas, como absorção, proteção, biocompatibilidade e potencial anti-microbiano. Para aumentar seus efeitos cicatrizantes, óleos naturais têm sido incorporados na matriz polimérica, a exemplo da copaíba, que possui elevada ação anti-inflamatória. Nesse contexto, o trabalho objetivou obter e caracterizar membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba para tratar feridas cutâneas. As membranas de quitosana com adição do óleo por emulsão e nanoemulsão foram sintetizadas pela técnica de evaporação de solvente. Foram avaliadas pela análise macroscópica e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial, percentual de intumescimento, umidade e ângulo de contato. Foi realizado ensaio *in vitro* de atividade antibacteriana frente à bactéria *S.aureus*. As membranas apresentaram aparência aparentemente finas, pouco maleáveis, relativa opacidade, homogeneidade e boa manuseabilidade. Observou-se porosidade mais numerosa nas superfícies das membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo de copaíba, além de comportamento mais amorfo. Percebeu-se uma melhor interação entre a quitosana e os

constituintes do óleo quando a síntese do óleo foi preparada por nanoemulsão, resultando na melhoria da estabilidade do material produzido. Os percentuais de intumescimento foram maiores nas composições MQCoN-0,1 ($214 \pm 3,22\%$), quando imersos na água e a composição MQCoN-5,0 ($220 \pm 6,83\%$) na solução em PBS. O comportamento mais úmido foi significativo nas membranas compostas por nanoemulsões do óleo de copaíba de 0,1 % ($0,80 \pm 1,37\%$) e 0,5 % ($3 \pm 0,79\%$). Não houve grande influência no ângulo de contato entre as sínteses e composições. A membrana de quitosana com 1,0 % (v/v) do óleo emulsionado e a membrana de quitosana com 0,5% (v/v) do óleo nanoemulsionado foram as membranas mais hidrofílicas. Todas as membranas foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, exceto a membrana de quitosana com 1,0%(v/v) de emulsão do óleo. Os materiais obtidos por nanoemulsão possuem atributos ideais para aplicação no uso de feridas cutâneas.

Palavras chave: Biomaterial, Cicatrização, Feridas Cutâneas, Quitosana, Óleo de copaíba.

Summary of the Thesis presented to PRODERNA / UFPA as part of the necessary requirements to obtain the degree of Doctor in Engineering of Natural Resources.

METHODS OF OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN
AND COPAÍBA BIOMEMBRANE FOR POTENTIAL USE IN WOUNDS

Sheila Barbosa Paranhos

Junho/2022

Advisor: Verônica Scarpini Candido.

Co-advisor: Marcele Fonseca dos Passos.

Concentration area: Transformation of Natural Resources

Health professionals deal directly with several complex situations in the care of sick people. Among these, there are skin wounds that can harm the patient's clinical condition, in addition to costly treatment for healing. Skin wounds require dressings to protect against pathogenic microorganisms and to accelerate the healing process. With the emergence of biomaterials available for use in wound treatment, chitosan has become an effective choice, easily found in a natural and renewable form with healing potential. The chitosan membrane presents ideal conditions in the treatment of wounds, such as absorption, protection, biocompatibility and antimicrobial potential. To increase its healing effects, natural oils have been incorporated into the polymer matrix, such as copaiba, which has a high anti-inflammatory action. In this context, the work aimed to obtain and characterize chitosan membranes by emulsion and nanoemulsion of copaiba oil to treat skin wounds. The chitosan membranes with oil addition by emulsion and nanoemulsion were synthesized by the solvent evaporation technique. They were evaluated by macroscopic analysis and characterized by scanning electron microscopy, X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, swelling percentage, humidity, contact angle. An in vitro assay of antibacterial activity against the bacterium *S.aureus* was carried out. The membranes had an apparently thin appearance, little malleability, relative opacity, continuous and good handling. He observed more porosity on the surfaces of membranes synthesized by nanoemulsion of copaiba oil, in addition to a more amorphous behavior. He noticed a better interaction between chitosan and oil constituents when the oil synthesis was prepared by nanoemulsion, resulting in improved stability of the material produced. The swelling percentages were higher in the MQCoN-0.1 ($214\pm 3.22\%$) compositions when

immersed in water and the MQCoN-5.0 composition ($220\pm 6.83\%$) in the PBS solution. The wetter behavior was significant in membranes composed of 0.1% ($0.80\pm 1.37\%$) and 0.5% ($3.00\pm 0.79\%$) copaiba oil nanoemulsions. There was no great influence on the contact angle between syntheses and compositions. The chitosan membrane with 1.0% (v/v) of emulsified oil and the chitosan membrane with 0.5% (v/v) of nanoemulsified oil were the most hydrophilic membranes. All membranes were able to inhibit bacterial growth, except the chitosan membrane with 1.0% (v/v) oil emulsion. Materials obtained by nanoemulsion have ideal attributes for application in the use of skin wounds.

Keywords: Biomaterial, Healing, Skin Wounds, Chitosan, Copaiba Oil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo Geral.....	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
1.2 JUSTIFICATIVA E INEDITISMO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 ESTRUTURAS DA PELE.....	17
2.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....	18
2.2.1 Tipo de feridas.....	20
2.2.2 Tratamento de feridas.....	20
2.3 BIOMATERIAIS.....	24
2.4 POLÍMEROS DE QUITOSANA.....	25
2.4.1 Propriedades biológicas da quitosana na cicatrização de feridas.....	29
2.5 ÓLEO DE COPAÍBA	32
2.5.1 Plantas do gênero <i>Copaífera spp</i>.....	32
2.5.2 Componentes bioativos do óleo de copaíba.....	33
2.5.3 Atividades biológicas do óleo de copaíba.....	35
2.5.4 Efeito do óleo de copaíba no tratamento de leishmaniose.....	36
2.5.5 Efeito do óleo de copaíba na cicatrização de feridas.....	38
2.5.6 Uso seguro do óleo de copaíba	39
2.5.5 Nanoemulsão do óleo de copaíba.....	41
3 METODOLOGIA.....	44
3.1 MATERIAIS.....	44
3.2 SÍNTESE DA EMULSÃO DO ÓLEO.....	44

	12
3.2.1 Preparação da solução de quitosana.....	44
3.2.2 Preparação da emulsão do óleo de copaíba.....	44
3.2.3 Preparação das membranas de quitosana por emulsão do óleo de copaíba..	45
3.3 SÍNTESE DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO.....	46
3.3.1 Preparação da nanoemulsão do óleo.....	46
3.3.2 Preparação das membranas por nanoemulsão do óleo.....	46
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA	48
3.5 TESTE DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS).....	48
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS SINTETIZADAS	49
3.6.1 Análise Macroscópica.....	49
3.6.2 Análise Morfológica.....	49
3.6.3 Análise de Difractometria de Raios X (DRX).....	50
3.6.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	50
3.6.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	50
3.6.6 Capacidade de Absorção/Grau de Intumescimento.....	51
3.6.7 Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato.....	52
3.6.7 Determinação de Umidade.....	52
3.6.8 Análise estatística.....	53
3.7 ENSAIO BIOLÓGICO.....	53
3.7.1 Teste de atividade antibacteriana.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
5 CONCLUSÃO.....	106
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
APÊNDICES.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração da pele humana e seus componentes.....	17
Figura 2	Ilustração das fases do processo de cicatrização.....	19
Figura 3	Representação molecular da quitina e quitosana.....	27
Figura 4	Representação esquemática da síntese de quitosana por método químico...	27
Figura 5	Árvore de <i>Copaífera</i> spp.....	32
Figura 6	Extração do óleo de copaíba	33
Figura 7	Estruturas químicas da copaíba com atividade antimicrobiana.....	34
Figura 8	Representação da partícula de nanoemulsão.....	41
Figura 9	Diagrama esquemático da síntese das membranas de quitosana por emulsão do óleo.....	45
Figura 10	Diagrama esquemático da síntese das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo.....	47
Figura 11	Tamanho médio da gota e polidispersividade das formulações do óleo de copaíba sonicada e sem sonicar.....	58
Figura 12	Micrografia da membrana de quitosana sem óleo (MQ).....	63
Figura 13	Micrografia das membranas: (a) quitosana/copaíba 0,1% v/v (MQCo-0,1); (B) quitosana/copaíba 0,5% v/v (MQCo-0,5)	63
Figura 14	Micrografia das membranas: (a) quitosana/copaíba 1,0% v/v (MQCo-1,0); (B) quitosana/copaíba 5,0% v/v (MQCo-5,0)	64
Figura 15	Micrografia das membranas de quitosana com nanoemulsões do óleo de copaíba: (a) MQCoN-0,1); (B) MQCoN-0,5	65
Figura 16	Micrografia das membranas de quitosana com nanoemulsões do óleo de copaíba: (a) MQCoN-1,0); (B) MQCoN-5,0	65
Figura 17	Difratograma de raios X das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão do óleo de copaíba. O asterisco (*) significa picos característicos da quitosana.....	67
Figura 18	Difratograma de raios X das membranas de quitosana sintetizadas por nanoemulsão do óleo de copaíba. O asterisco (*) significa picos característicos da quitosana.....	69
Figura 19	Comparação entre os espectros na região do Infravermelho do pó de quitosana e membrana de quitosana sem do óleo (MQ).....	70
Figura 20	Comparação entre os espectros na região do Infravermelho das	

	membranas de quitosana por emulsão do óleo e membrana de quitosana sem óleo (MQ).....	72
Figura 21	Comparação entre os espectros na região do Infravermelho das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo e membrana de quitosana sem óleo (MQ).....	74
Figura 22	Análise DSC (segunda temperatura de aquecimento) das membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo.....	76
Figura 23	Percentual de intumescimento da membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membrana de quitosana por emulsão do óleo, em meio aquoso, em função do tempo.....	78
Figura 24	Percentual de intumescimento da membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membrana de quitosana por emulsão do óleo, imersos em PBS, em função do tempo.....	79
Figura 25	Comparação dos percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por emulsão do óleo de copaíba, após 24 horas de imersão na água e PBS. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.....	82
Figura 26	Comparação dos percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba, após 24 horas de imersão na água e PBS. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.....	83
Figura 27	Percentual de intumescimento da membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membrana de quitosana por nanoemulsão do óleo, imersos em PBS, em função do tempo.....	84
Figura 28	Comparação dos percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba, após 24 horas de imersão na água e PBS. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.....	86
Figura 29	Comparação dos percentuais de umidade entre a membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membranas de quitosana por emulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.....	89
Figura 30	Comparação dos percentuais de umidade entre a membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.....	89
Figura 31	Comparação dos percentuais de umidade entre a membrana de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.....	90
Figura 32	Comparação do ângulo de contato entre a membrana de quitosana sem	

óleo (MQ) e membranas de quitosana por emulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa..... 94

Figura 33 Comparação do ângulo de contato entre a membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa..... 95

Figura 34 Comparação do ângulo de contato entre a membrana de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa..... 96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais tipos de produtos para curativos no tratamento de feridas.....	21
Quadro 2	Descrição dos materiais utilizados para a síntese das membranas	45
Quadro 3	Descrição das siglas e composições de cada membrana sintetizadas por emulsão do óleo	46
Quadro 4	Descrição das siglas e composições de cada membrana sintetizadas por nanoemulsão do óleo	48
Quadro 5	Descrição das composições das membranas por nanoemulsão testadas ..	49
Quadro 6	Características macroscópicas das membranas.....	60
Quadro 7	Relação entre as bandas e grupos funcionais da membrana de quitosana (MQ).....	71
Quadro 8	Relação entre bandas e grupos funcionais do óleo de copaíba.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do óleo de copaíba-em destaque (*) os componentes majoritários.....	54
Tabela 2	Tamanho médio das gotas e polidispersividade das emulsões do óleo de copaíba sonicada e sem sonicar.....	57
Tabela 3	Resultados da análise de variância (ANOVA), fator único, realizada para avaliar o intumescimento das membranas por emulsão do óleo, após 24 horas de imersão na solução de água e PBS.....	81
Tabela 4	Resultados da análise de variância (ANOVA), fator único, realizada para avaliar o intumescimento das membranas por nanoemulsão do óleo, após 24 horas de imersão na solução de água e PBS.....	85
Tabela 5	Percentual de umidade das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo.....	87
Tabela 6	Resultados da análise de variância (ANOVA), fator único, realizada para avaliar o percentual de umidade entre as membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo.....	88
Tabela 7	Comparação do ângulo de contato das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo.....	91
Tabela 8	Comparação do teste da gota séssil para análise do ângulo de contato	92
Tabela 9	Resultados da análise de variância (ANOVA), fator único, realizada para avaliar os valores do ângulo de contato entre as membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo.....	93
Tabela 10	Teste de atividade antibacteriana, em meio sólido, contendo <i>S.aureus</i> , das membranas de quitosana por emulsão e nanomeulsão do óleo.....	97

1 INTRODUÇÃO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, responsável pelo revestimento externo corporal, com múltiplas funções importantes para a manutenção da estabilidade do organismo (ROGER *et al.*, 2019). Esse órgão é constituído por várias camadas de tecidos ectodérmicos que fornecem mecanismos de barreira contra patógenos, agentes ambientais externos (luz, calor, lesões) e confere proteção às estruturas internas do organismo (IBRAHIM *et al.*, 2018).

A interrupção da integridade da pele pode ser provocada por algum trauma acidental ou intencional, ou ainda ser desencadeada por uma doença (HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ; 2009). Essa ferida causa desequilíbrio dos mecanismos funcionais da pele, e pode permitir a entrada de microorganismos patogênicos e conseqüentemente levar a ferida a cicatrizar mais lentamente (HO *et al.*, 2021).

A cicatrização da ferida é uma resposta fisiológica do organismo à lesão tecidual, todavia, é um processo biológico complexo, que envolve uma série de eventos distintos e interdependentes para o fechamento da ferida (WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2020; HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014;). Fisiologicamente, a cicatrização pode ser dividida em quatro fases distintas, mas que interagem e se sobrepõem para a completa reparação do tecido: hemostasia; inflamação; proliferação e remodelação (HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014).

A hemostasia é a primeira fase da cicatrização de uma ferida, responsável pelo controle do sangramento por vasoconstrição e coagulação sanguínea (FENG *et al.*, 2021). Para a ferida cicatrizar no tempo oportuno, a próxima fase - a inflamatória - assume papel importante na liberação de células de defesa do organismo para proteger a ferida contra infecções, ativando a angiogênese (IBRAHIM *et al.*, 2018). O estímulo de células proliferativas são fundamentais para cobrir a ferida com a formação do tecido de granulação na fase de proliferação (FENG *et al.*, 2021). Por fim, a ferida se repara na fase de remodelação, induzida por fibroblastos e colágenos (IBRAHIM *et al.*, 2018).

Muitos fatores podem afetar potencialmente a cicatrização, como por exemplo, a desnutrição, hipóxia, doenças crônicas e cirurgias, resultando no aumento da morbidade e mortalidade do paciente e retardo na cicatrização de feridas (HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014; SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

As feridas que não cicatrizam com facilidade exigem tratamentos mais caros e períodos longos de internação, gerando gastos econômicos elevados para o sistema de saúde e consequências psicológicas imensuráveis ao paciente (CHOUHAN *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019; HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014). Estima-se que os custos anuais ambulatoriais e hospitalares de feridas complexas, ao Sistema Único de Saúde (SUS), no Brasil resultaram em 361 milhões de reais, no ano de 2014 (TOSCANO *et al.*, 2018).

O mercado de produtos para curativos modernos vem desenvolvendo diversos tipos de materiais para tratar feridas, porém é preciso escolher o material apropriado para ajudar a ferida a cicatrizar de maneira mais rápida (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Os biomateriais têm sido uma opção bastante escolhida no campo da saúde como um material avançado para substituir ou complementar uma função do tecido ou órgão, sendo capaz de entrar em contato com o organismo humano e induzir respostas desejáveis (PERIAYAH; HALIM; SAAD, 2016; NAOMI *et al.*, 2021). Existem biomateriais sintéticos e naturais que possuem uma série de propriedades vantajosas e benéficas para cicatrização de lesões cutâneas (ARAMWIT, 2016).

A aplicação de biomateriais naturais tem surtido grandes resultados na cicatrização de feridas devido suas qualidades versáteis como: bioatividade, biocompatibilidade, biodegradação, baixa ou nenhuma toxicidade, estabilidade mecânica, alto teor de umidade e alta disponibilidade (CHEN; LIU, 2016; HE *et al.*, 2018).

A maioria dos biomateriais usados na cicatrização de feridas é derivada de biopolímeros oriundos principalmente das proteínas e polissacarídeos (KUMAR *et al.*, 2018). Para biomateriais naturais, a quitosana é um dos biopolímeros mais investigados para aplicações na cicatrização de feridas (MOEINI *et al.*, 2020). É um polissacarídeo catiônico natural, preparado industrialmente pela hidrólise dos grupos aminoacetil da quitina, possuindo uma diversidade de aplicações bem sucedidas como biomaterial (GIRI *et al.*, 2021).

Muitos estudos têm comprovado a potencialidade da quitosana na cicatrização acelerada de feridas, bem como seu papel importante no crescimento do tecido de granulação, como agente hemostático, anti-inflamatório e antimicrobiano (AHMED; IKRAM, 2016; FENG *et al.*, 2021; GAISLLER *et al.*, 2021; BASSERI *et al.*, 2019).

Terapias alternativas para tratamento de feridas à base de plantas medicinais têm ganhado importância nos últimos anos, devido a presença de moléculas bioativas derivadas de plantas que podem atuar potencialmente como agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios, acelerando o processo de cicatrização (WINKELMAM, 2018; MOEINI *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2021).

De acordo com TRINDADE *et al.* (2018) a oleorresina de árvores *Copaífera spp.*, popularmente conhecida por óleo de copaíba, tem sido amplamente utilizada como medicamento natural pela população amazônica há milhares de anos, e mantém essa tradição milenar como um tratamento popular de várias doenças, inclusive na cura de feridas.

O β -cariofileno é um dos principais sesquiterpenos detectados em maior quantidade nos estudos de composição química da oleorresina de copaíba, com potencial ação anti-inflamatória (TEIXEIRA *et al.*, 2017; VEIGA *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado que o tratamento com óleo de copaíba administrados oralmente e por via tópica apresentam efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antinoceptivos, antibacterianos, antissépticos e cicatrizantes (AMES-SIBIN *et al.*, 2018; BECKER *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2021; DIAS *et al.*, 2013; ALVARENGA *et al.*, 2020).

A incorporação dos óleos medicinais hidrofóbicos fitoterápicos em matrizes biopoliméricas pode ser uma opção favorável para melhorar ou potencializar propriedades, preservando a biofuncionalidade do polímero (PASCOAL *et al.*, 2020).

Na literatura existem relatos dos benefícios do óleo de copaíba e materiais poliméricos como recurso terapêutico alternativo para aplicação em biomateriais. Sobre isso, MARANGON *et al.* (2017), conseguiram obter efeitos antibacterianos contra o patógeno *Staphylococcus aureus*, utilizando a emulsão composta de copaíba incorporada na quitosana e gelatina.

O óleo de copaíba associado a biopolímeros pode ser usado como curativo tópico, auxiliando também no tratamento da leishmaniose cutânea (PASCOAL *et al.*, 2017). A combinação do óleo com a quitosana pode potencializar propriedades de filmes relacionadas à resistência e a barreira do material (DEBONE *et al.*, 2018).

Para XAVIER JÚNIOR *et al.* (2019) o óleo de copaíba foi benéfico, em nanocápsulas revestidas de quitosana, ajudando a melhorar a ação da droga anticancerígena. Comprovou-se ainda por meio de estudo *In vivo*, que a utilização do óleo

de copaíba e de polímeros formulados em hidrogel sobre edemas locais em camundongos resultaram na redução do processo inflamatório (LUCCA *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de materiais para curativos, ainda existem lacunas para serem investigadas sobre o processo de cicatrização, principalmente relacionada ao mecanismo de ação dos produtos utilizados no tratamento feridas. Além disso, há poucos estudos que tratam do composto óleo de copaíba e quitosana no tratamento de feridas cutâneas.

Diante desse contexto, o objetivo do presente estudo foi a obtenção e caracterização da membrana de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba como possível aplicação no tratamento de feridas cutâneas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Obter e caracterizar membranas à base de quitosana e óleo de copaíba, sintetizadas por emulsão e nanoemulsão, para aplicação em feridas cutâneas.

1.2.2 Específicos

- Sintetizar membranas por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba, em faixas de concentrações distintas, incorporado na quitosana.
- Comparar o tamanho das gotículas e o índice de polidispersividade das emulsões do óleo sonicadas e das emulsões sem sonicação.
- Caracterizar as membranas sintetizadas quanto a microestrutura (MEV), propriedades físico-químicas, térmicas (DRX e DSC) e FTIR.
- Estudar o comportamento de intumescimento, umidade e o ângulo de contato das membranas sintetizadas.
- Comparar as características das membranas produzidas por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba e quitosana.
- Avaliar a capacidade de inibição de crescimento bacteriano das membranas obtidas contra a cepa *Staphylococcus aureus*.
- Indicar para qual o tipo de ferimento pode ser aplicado as membranas produzidas.

Diante dos objetivos apresentados, o estudo pretende responder a seguinte hipótese: Os métodos de síntese do óleo de copaíba por emulsão e nanoemulsão

incorporados na quitosana terão efeitos significativos no padrão morfológico, físico-químico, térmico e biológico das membranas sintetizadas?

1.2 JUSTIFICATIVA E INEDITISMO

As feridas podem levar a problemas clínicos complexos para o paciente e custos substanciais significativos, portanto, o tratamento adequado pode melhorar o processo de cicatrização e contribuir para evitar danos adicionais (GUEST *et al.*, 2015). O curativo ideal deve levar em consideração custos relativamente razoáveis e trazer benefícios para o paciente (MOEINI *et al.*, 2020).

O custo com feridas ainda é uma preocupação, porque a maioria dos avanços na terapêutica de tratamento de feridas é altamente cara (CHOUHAN *et al.*, 2019). De acordo com o relatório Global do Mercado de Tratamento de Feridas realizado no ano de 2016, estima-se que o custo com tratamento de feridas irá atingir um valor em torno de 26,24 bilhões até o final de 2023 (WELLER; TEAM; SUSSMAN, 2020).

A escolha da quitosana como material para curativo é devido à ampla disponibilidade e baixo custo (EFTEKARI *et al.*, 2019). Além do mais, pode ser derivada de recursos naturais renováveis provenientes de resíduos de alimentos, com propriedades interessantes, como alta biocompatibilidade e fácil processamento químico (TAKESHITA *et al.*, 2021). Por isso, esse produto é também considerado um tratamento ecologicamente correto, pois reaproveita a matéria-prima desperdiçada para fins terapêuticos, reduzindo o impacto ambiental.

Já foi comprovada, por pesquisadores, que a quitosana desempenha funções importantes em todas as fases de cicatrização de feridas; portanto, benéfica para tratamento das mesmas (FENG *et al.*, 2021). Diante do que foi exposto, a quitosana é um biomaterial economicamente viável e eficiente no tratamento de pacientes com feridas.

O óleo de copaíba é um recurso natural abundante na biodiversidade da Amazônia brasileira, utilizada há séculos por povos tradicionais com fins terapêuticos, principalmente como anti-inflamatório e cicatrizante (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2017; ALVARENGA *et al.*, 2020). Apesar do conhecimento popular da ação curativa do óleo de copaíba, ainda é pouco expressivo na literatura médica os resultados mostrando a ação, eficácia e atividades farmacológicas da utilização desse óleo em feridas.

Por outro lado, observa-se o interesse crescente por produtos para curativos obtidos por fontes naturais, descobrindo compostos bioativos presente no óleo vegetal, como a copaíba, que estimulem a cicatrização de feridas (IBRAHIM *et al.*, 2018).

Por isso, é fundamental ampliar pesquisas sobre o óleo de copaíba e conhecer a potencialidade desse recurso terapêutico quando associado com a quitosana para aplicação favorável como biomaterial.

Recentemente, DEBONE *et al.* (2018) pesquisaram diferentes concentrações de filmes de quitosana-óleo de copaíba para aplicação em curativos, mas neste trabalho, os autores não investigaram a combinação de várias concentrações do óleo (0,1, 0,5, 1,0 e 5,0% v/v) na solução de quitosana (1,0% v/v). Além disso, não pesquisou atividade antibacteriana, o ângulo de contato, intumescimento, teor de umidade, difração de raios-X e espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier de filmes. A análise estatística para validar os resultados não foram realizados no estudo.

No presente trabalho, foi feita uma análise estatística detalhada dos resultados de ângulo de contato, intumescimento e teor de umidade, e a interação de quitosana e óleo de copaíba foi pela primeira vez estudada em diferentes concentrações como uma abordagem para desenvolver uma membrana que pudesse ser benéfica como um curativo ativo para feridas na pele. Além disso, foi utilizada síntese por nanoemulsão e emulsão do óleo para analisar a influência dos métodos na produção das membranas.

Desta maneira, constata-se o ineditismo e originalidade do estudo, visto que as diversas composições do óleo de copaíba, assim como o método de nanoemulsão do fitoterápico ainda não havia sido investigados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURAS DA PELE

A pele é um sistema complexo e vital, responsável pelo revestimento do corpo humano, respondendo por aproximadamente 16% do peso corporal total, portanto o maior órgão, com função protetora às ações do ambiente externo às estruturas internas, responsável por várias funções que mantêm o equilíbrio homeostático do organismo, evitando a perda de água e eletrólitos (ROGER *et al.*, 2019).

Dessa maneira é importante considerar as estruturas e funções da pele com a finalidade de aprimorar um material para curativos em feridas com atributos que se aproximam de suas propriedades.

A Figura 1 mostra a estrutura anatômica da pele constituída por três camadas com características distintas: epiderme, derme e hipoderme.

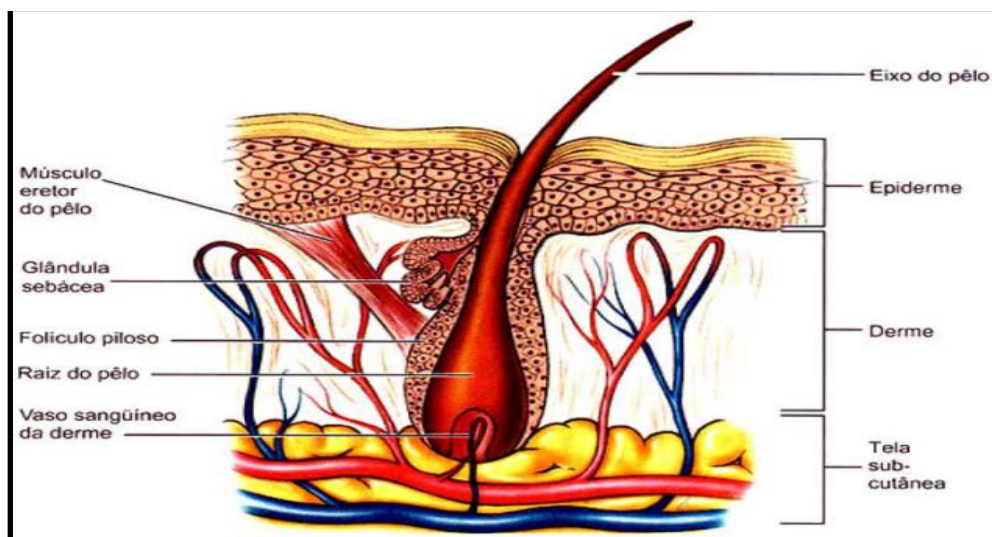


Figura 1- Ilustração da pele humana e seus componentes.

A epiderme é a camada mais externa que funciona como barreira protetora da pele contra as agressões externas e mantém a hidratação e regeneração da pele (SOUTO *et al.*, 2020). Os queratinócitos, melanócitos, as células de Langherans, as células ou discos de Merkel estão presentes entre a epiderme e derme, ligando-se as terminações nervosas sensitivas atuando como receptores de tato ou pressão (DOMANSKY; BORGES, 2012).

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, uma camada espessa rica em proteínas da matriz extracelular (ECM), constituída de folículos pilosos, glândulas sudoríparas e também fibroblastos dérmicos, que confere à pele sua resistência à tração (MOORE *et al.*, 2018).

A última camada é constituída pela hipoderme ou tela subcutânea, camada interna da pele, formada principalmente por adipócitos e células endoteliais, com funções de fornecer energia e nutrientes por meio de capilares microvasculares à derme e epiderme, tendo papel fundamental na vascularização (OUALLA-BACHIRI *et al.*, 2020).

A pele apresenta características viscoelásticas importantes para manutenção de sua integridade, conferindo uma resistência. No entanto, essa estrutura de força mecânica pode sofrer ações do meio externo provocando lesões. Para proteção da pele rompida, os materiais de curativos ideais devem exibir alto alongamento e boa resistência à tração, de outro modo, qualquer leve estímulo externo nas proximidades da ferida poderá causar rompimento do curativo (HO *et al.*, 2021).

2.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Quando há uma ferida na pele, o organismo induz uma série de eventos fisiológicos sucessivos e dinâmicos envolvendo uma interação complexa entre vários tipos de células, citocinas, mediadores e o sistema vascular, a fim de obter uma restauração rápida da estrutura e função da pele (WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2020; JAYAKUMAR, 2011).

Classicamente, esse processo de cicatrização de feridas consiste em quatro fases distintas que estão interdependentes e sobrepostas entre si: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tecidual (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). O conhecimento desses estágios no processo de cicatrização, bem como o entendimento dos materiais de curativo apropriados é fundamental para o tratamento seguro e bem sucedido na ferida. A Figura 2 ilustra as fases do processo de cicatrização.

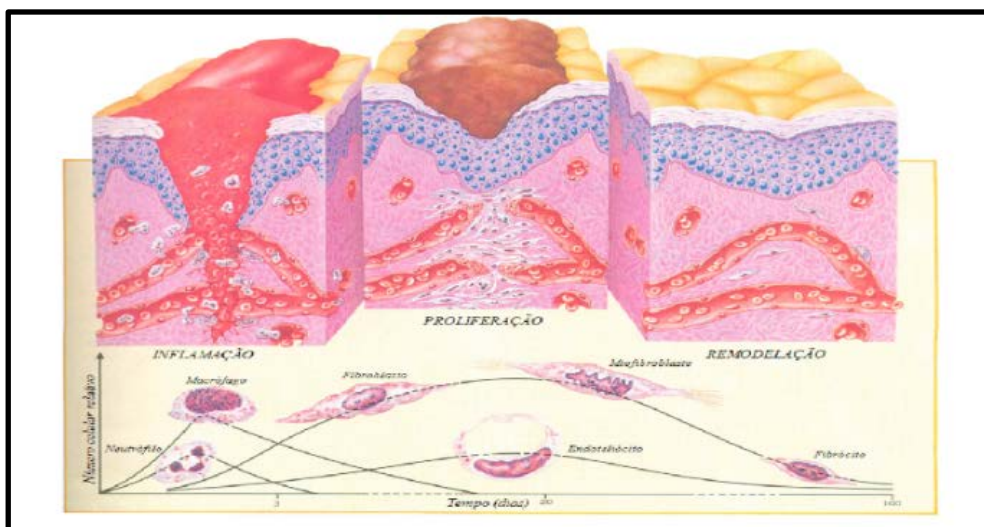


Figura 2- Ilustração das fases do processo de cicatrização (ISAAC *et al.*, 2010).

Logo após a lesão na pele, a hemostasia inicia com formação de coágulos para interromper a hemorragia através da contração dos vasos sanguíneos e a agregação plaquetária (RIDIANDRIES; TAN; BURSILL, 2018; FENG *et al.*, 2021). A próxima fase é a inflamação, na qual macrófagos e neutrófilos são recrutados para remover detritos do local da ferida e evitar infecção e após alguns dias secretam vários fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas para estimular a angiogênese (RIDIANDRIES; TAN; BURSILL, 2018; IBRAHIM *et al.*, 2018). Em seguida as células epiteliais proliferam e migram para formar tecido de granulação para cobrir a ferida na fase de proliferação, mediadas pelas células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos e colágeno na área da ferida, formando uma matriz extracelular temporária (RIDIANDRIES; TAN; BURSILL, 2018; FENG *et al.*, 2021). O estágio final no processo de cicatrização de ferida é a remodelação, na qual os fibroblastos reorganizam a matriz de colágeno, aumentando a resistência à tração e restaurando a integridade estrutural do tecido e a competência funcional (RIDIANDRIES; TAN; BURSILL, 2018; IBRAHIM *et al.*, 2018).

Muitos fatores podem interferir no processo, resultando no retardamento da cicatrização de feridas (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). Algumas das principais causas de comprometimento da cicatrização de feridas está relacionado a fatores subjacentes, bem como infecções, envelhecimento, nutrição, hipóxia, estresse, medicamentos, genética e doenças crônicas (GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018; GUSHIKEN *et al.*, 2021).

2.2.1 Tipos de feridas

Uma ferida é definida como uma ruptura na continuidade do revestimento epitelial da pele ou mucosa resultante de lesões mecânicas, físicas, térmica ou metabólicas (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; CHAUDHARI *et al.*, 2016). A ferida é classificada em aguda ou crônica, de acordo com a duração e a natureza do processo de cicatrização (SHE *et al.*, 2020).

Há feridas que ocorrem repentinamente e cicatrizam em um determinado período de tempo previsível, geralmente dentro de 8-12 semanas, progressão normal e ordenada, conhecida como feridas agudas, como aquelas criadas por cirurgia ou trauma (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). A maioria das pequenas feridas é curada pela simples contração e crescimento das células dentro

da ferida (CHAUDHARI *et al.*, 2016). Por outro lado, as feridas crônicas levam a desregulação ou interrupção de fases do processo normal de cicatrização, e não podem ser reparadas de maneira ordenada e oportuna (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

Por isso, a cobertura de feridas precisa ser estabelecido o mais breve possível para prevenir complicações ao portador de feridas.

2.2.2 Tratamento de feridas

Os curativos são desenvolvidos para cobertura de feridas para proteção à agentes exógenos e traumas mecânicos, redução dos riscos de infecções e aceleração do processo de cicatrização (WANG *et al.*, 2018).

Os curativos podem ser divididos em duas categorias: curativos tradicionais e curativos modernos (SHE *et al.*, 2020). Dentre os curativos tradicionais encontram-se gazes, ataduras e emplastro, geralmente usados como curativos primários em feridas limpas e secas com pouca exsudação ou como curativos secundários (SOUTO *et al.*, 2020). No entanto, seus benefícios são restritos, devido danos secundários produzidos durante a retirada como dor e adesão ao tecido de granulação e não confere proteção contra infecções nem tão pouca umidade para a ferida (SHE *et al.*, 2020).

Por outro lado, curativos modernos vão além da cobertura da ferida, cria um ambiente úmido para favorecer a cicatrização, portanto ideal para manter o equilíbrio constante da temperatura e da umidade da ferida (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Por muitos anos os curativos tinham a finalidade de manter a ferida seca removendo o excesso de exsudato (GUSHIKEN *et al.*, 2021). Todavia, nos tempos atuais, foi constatado que o ambiente quente e úmido pode favorecer a cicatrização da ferida (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). Por esse motivo, os curativos modernos vêm sendo mais usados por manter esse ambiente da ferida úmido (SOUTO *et al.*, 2020).

Antigamente, acreditava-se que os curativos abertos cicatrizavam a ferida mais rapidamente, entretanto foi percebido que os curativos oclusivos promovem a aceleração da reepitelização, induzem a síntese de colágeno, estimula a angiogênese a partir da hipóxia no leito da ferida e diminui o pH do leito da ferida, o que leva à diminuição da invasão bacteriana na ferida (SARABAH, 2012).

Portanto, um bom curativo deve oferecer proteção à área da ferida, retirar o excesso de exsudatos, permitir a troca gasosa, manter um ambiente úmido no leito da ferida, ser de fácil manuseio, prevenir infecções, estimular fatores de crescimento, isolar proteases, facilitar o desbridamento autolítico e promover a produção de tecido de granulação e reepitelização (SHI *et al.*, 2020; SOUTO *et al.*, 2020).

Contudo, atualmente, não existem curativos que consigam atender a todas essas funções para isso, a seleção específica de curativos modernos para feridas deve ser baseada nas condições particulares, como a doença primária do paciente, as características do curativo, e especialmente os mecanismos fisiológicos das feridas (SHI *et al.*, 2020).

Os curativos para feridas podem apresentar diferentes formas físicas, como esponjas, filmes, membranas, hidrogéis ou hidrocolóides, de acordo com o tipo específico de ferida (SIMÕES *et al.*, 2018).

No Quadro 1 são descritos os principais tipos de materiais utilizados no tratamento de feridas.

Quadro 1- Principais tipos de produtos para curativos no tratamento de feridas.

Características do curativos para feridas	Tipo de Material	Importância na cicatrização de feridas	Desvantagem de uso
Gaze	Fibras naturais ou sintéticas (fios de algodão ou fibras de poliéster)	- Absorve o exsudato das feridas - Mantêm o ambiente úmido. - Pode ser usado em combinação com outros aditivos	-Remoção traumática -Barreira limitada contra microorganismos
Filme fino de poliuretano	Polímero de origem sintética	- Permite troca de gases, mas serve como uma barreira para bactérias. -Permite a inspeção da ferida, devido sua cor transparente	-Quando usados em feridas com alto teor de exsudato produz acúmulo e maceração
Espumas	Polímero sintético	- Absorve altos exsudatos - Mantêm o ambiente úmido ao redor do leito da ferida - Permite a troca gasosa - Isolamento térmico - Fácil remoção - Efeito de amortecimento	- Troca frequente do curativo

Hidrogéis	Polímeros naturais ou sintéticos (quitosana, alginato de fibrina, ácido hialurônico, dextrana)	<ul style="list-style-type: none"> - Doa umidade para feridas secas e com pouco exsudato -Facilmente removido -Debridamento leve 	Não é adequada para feridas infectadas
Hidrogéis de alginato		<ul style="list-style-type: none"> - Alta capacidade de absorção de exsudatos - Mantêm o ambiente úmido - Facilita o desbridamento autolítico 	
Hidrocolóides	Agentes coloidais (gelatina ou à base de pectina, carboximetilcelulose)	<ul style="list-style-type: none"> - Absorvem exsudatos -Adere na ferida - Permeável a água e gás - Fornece isolamento térmico -Fornecer ambiente úmido - Fácil remoção - Longo tempo de uso 	- Não é adequada para feridas infectadas ou altamente exsudativas, pois a pouca troca de vapor de água com o ambiente
Matrizes nanofibradas eletrofiadas	Polímeros naturais e sintéticos ou compostos de polímero (PCL, PLLA, PLGA, PCL-PEG, PLACL, gelatina, GelMA)	<ul style="list-style-type: none"> - Pode imitar a estrutura do ECM - Permite troca de gás e fluido - Boa aderência - Preserva a atividade da droga por um período relativamente longo -Permite a liberação gradual do medicamento encapsulado - Pode ser revestido com compostos ativos 	-A distribuição de tamanho de poro pequeno reduz a taxa de infiltração celular e crescimento interno
Materiais compostos	Hidrogéis ou construções eletrofiadas com formulações de nanopartículas incorporadas feitas de materiais cerâmicos, metálicos ou poliméricos (óxido de zinco, óxido de	<ul style="list-style-type: none"> - A incorporação de partículas melhora o potencial como ferramenta de entrega de drogas - Os materiais compostos combinam as propriedades benéficas dos componentes incorporados 	-Fabricação se torna mais complexa

	titânio, prata, PLGA, PCL, hialuronano, alginato, etc.)		
Andaimes de duas camadas	Polímeros naturais e sintéticos (quitosana)	<ul style="list-style-type: none"> - A estrutura em camadas permite a liberação local da droga em cada camada da pele - A funcionalidade variável e a estrutura das camadas podem melhorar a regeneração da pele em toda a espessura 	A fabricação se torna mais complexa e cara

Fonte: Saghazadeh *et al.*, (2018); Sarabahi (2012).

Com base nesse contexto, os curativos funcionam como um tratamento importante no manejo em feridas (CHOUHAN *et al.*, 2019). No entanto, têm-se observado ao longo da prática clínica a eficiência limitada dos curativos tradicionais disponíveis, conferindo apenas uma proteção externa da ferida e um ambiente seco (SHI *et al.*, 2020). Os autores afirmam ainda que os curativos modernos vêm superando os curativos tradicionais quanto a eficácia na prevenção de infecções, aceleração da cicatrização e redução da dor (SHI *et al.*, 2020).

Portanto, alguns fatores são essenciais na escolha do material ideal para o tratamento de feridas, como a manutenção da umidade, a promoção da troca gasosa, proteção contra infecções e a capacidade de absorção de fluidos da ferida, assim como, ser atóxico, não alérgico e de fácil remoção (ABD EL-HACK *et al.*, 2020).

As vantagens da quitosana são extraordinárias, uma vez que pode ser facilmente processada em diferentes formas, como membranas, esponjas, géis, andaimes, micropartículas, nanopartículas e nanofibras para uma variedade de aplicações biomédicas, como administração de drogas, terapia genética, engenharia de tecidos e tratamento de feridas (ANITHA *et al.*, 2014).

A quitosana na forma de membrana apresenta características importantes no tratamento de feridas, uma vez que possui capacidade de absorção de exsudatos, fornece umidade e tem um sistema de liberação controlada de drogas, nutrientes, gases e proteínas (TAMER *et al.*, 2020). Além disso, seus grupos amino, hidroxila e carboxila podem ser facilmente reagidos e quimicamente modificados, contribuindo na formação

de sistema composto com outros materiais naturais e sintéticos (MADNI *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2018).

2.3 BIOMATERIAIS

Os biomateriais têm sido usados para a cicatrização em feridas desde os primórdios da civilização humana. SHAH (2011) mostra a existência de alguns escritos antigos, aos quais descrevem o uso de alguns materiais naturais, como óleo, ervas, mel, graxas, fibra vegetal no tratamento de feridas, evidenciando que na antiguidade já haviam preocupações com a cobertura e oclusão das feridas, e a cura empiricamente associado ao efeito desses materiais no combate às infecções e, assim, na promoção da cicatrização das feridas.

Há uma abrangência na definição de biomateriais, entretanto, o descrito por SUSMITA *et al.* (2018), parece apropriado para esse estudo, haja vista que o definem como materiais úteis na reparação de partes do corpo que sofreram danos a partir da interação com sistemas vivos, substituindo um componente do corpo humano ou auxiliando funções fisiológicas. Assim, os biomateriais são interessantes para cicatrização de feridas, uma vez que interagem com as células, tecidos ou órgãos humanos e, por vezes, até desempenham as suas funções.

Do ponto de vista da ciência dos materiais, os biomateriais podem ser classificados em quatro grupos diferentes como metais, cerâmicas, polímeros e compostos. Nas últimas décadas, os biomateriais a base de polímeros vem desempenhando papel importante em todas as aplicações biomédicas.

De acordo com a origem, os biomateriais poliméricos podem ser sintéticos ou naturais. CHEN e LIU (2016) dividem os biomateriais poliméricos derivados naturalmente em dois grupos: biomateriais à base de proteínas (por exemplo, colágeno, fibroína de seda, gelatina, fibronectina, queratina, fibrina e membrana da casca de ovo) e biomateriais à base de polissacarídeo (por exemplo, hialuronano, celulose, glicose, alginato, condroitina e quitina e seu derivado, quitosano).

Os polímeros naturais são vistos por KULINETS (2015) como materiais frequentemente semelhantes, senão idênticos, às substâncias macromoleculares que o sistema biológico pode reconhecer e processar por meio de vias metabólicas. Dessa maneira, permite que o material funcione a nível molecular e suprime a resposta inflamatória, permitindo que o material seja metabolizado por mecanismos fisiológicos

(enzimas). Como resultado, os problemas de toxicidade e reação inflamatória crônica, provocada por muitos polímeros sintéticos, são evitados. Além disso, eles podem fornecer sinais bioquímicos que promovem a cura do tecido ou a integração.

O avanço na ciência dos polímeros que ocorreu em meados do século XX trouxe uma grande variedade de polímeros para aplicações médicas. Eles são usados principalmente para aplicações sem carga, como próteses vasculares, cateteres, auxiliares de entrega de drogas, prótese facial, pele / cartilagem, prótese intraocular e em conjunto com metais em ortopedia e odontologia. As classes modernas de biomateriais poliméricos também incluem materiais poliméricos em formas de líquido, filme e gel que são usados como medicamentos adesivos e selantes, revestimentos, materiais anti-aderentes e enchimentos (KULINETTS, 2015).

2.4 POLÍMEROS À BASE DE QUITOSANA

De acordo com RIBEIRO *et al.* (2020) os polímeros como a celulose, alginato, quitosana e ácido hialurônico vem sendo estudados no desenvolvimento de diversos tipos de formulações como hidrogéis, filmes, géis, membranas, andaimes, nanopartículas, membranas nanofibras e spray tópico para tratamento em infecções de pele. A eficácia dessas biomoléculas está relacionada às suas propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, polifuncionalidade, alta reatividade química, quiralidade, quelação e capacidade de adsorção.

IGE *et al.* (2012) caracterizam os polímeros como polissacarídeos pertencentes à classe de macromoléculas compostos de açúcares simples e têm duas funções principais. Alguns, como a celulose, servem como materiais estruturais em sistemas vivos. Os polissacarídeos podem ser utilizados como materiais na medicina que incluem gerenciamento de feridas, engenharia de tecidos, sistemas de distribuição de drogas e dispositivos hemostáticos, entre outros. Por isso, possuem tendência de ser extremamente bioativos e geralmente são derivados usando diferentes abordagens biotecnológicas de matéria-prima agrícola ou resíduos da casca de crustáceos (ANITHA, 2014).

A quitosana é considerada um recurso natural bastante utilizado como biomaterial com múltiplas aplicações biomédicas, graças às suas inúmeras vantagens essenciais para o desenvolvimento de materiais com uso médico. IGE *et al.* (2012) apontam em seus estudos que tais vantagens da quitosana estão relacionadas com a capacidade de

interação com o tecido, não causando reações alérgicas, nenhuma ou baixa toxicidade à degradação no organismo. Associa-se também, a capacidade de inibição de microorganismos patogênicos, além de outras ações farmacológicas como aceleração da coagulação sanguínea e, portanto ajuda na cicatrização de feridas.

A quitosana pode ser considerada um dos polímeros naturais mais importantes para produção de curativos devido à participação ativa durante todo o processo de cicatrização da ferida, além de evitar a infecção microbiana, não causar toxicidade no organismo e ser biocompatível. Desse modo, curativos à base de quitosana mostra a importância deste biopolímero na aceleração do processo de cicatrização de feridas, e podemos considerar a quitosana uma solução econômica não só para o tratamento de feridas agudas, mas também no caso de feridas crônicas graves, como úlceras diabéticas (MATICA *et al.*, 2019).

A quitosana é um polissacarídeo semi-cristalino, que contém *N*-acetil-*D*-glucosamina e *D*-glucosamina resíduos dispostos em dimensão linear, de acordo com a Figura 3. É de natureza catiônica, devido à presença do grupo amino ($-NH_2$) em sua estrutura (MADNI, 2021). Essa carga positiva ajuda na formação da matriz extracelular, permitindo que a quitosana interaja com espécies carregadas negativamente, como os glicosaminoglicanos (GAGs) e glóbulos vermelhos (SHEIKHOESLAM *et al.*, 2018). Além disso, a presença de grupos hidroxila ($-OH$) e amina primária na estrutura da quitosana permite modificações químicas para obter propriedades e funcionalidades desejadas (SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016).

A quitosana é extraída por meio da desacetilação parcial da quitina, um dos biopolímeros renováveis mais abundantes do planeta, que pode ser obtido a baixo custo em fontes marinhas. A quitina é o principal componente estrutural encontrado no exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo e lagosta, e também pode ser encontrado no exoesqueleto de moluscos e insetos, bem como nas paredes celulares de fungos (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017).

A Figura 3 apresenta a característica distintiva entre quitina e quitosana. A presença do grupo acetil na quitina, que pode ser removido por meio de processos químicos ou enzimáticos para produzir quitosana (PANDEY *et al.*, 2017). Entretanto, o método químico é mais utilizado devido à larga escala da matéria-prima tornando a produção um custo econômico mais viável.

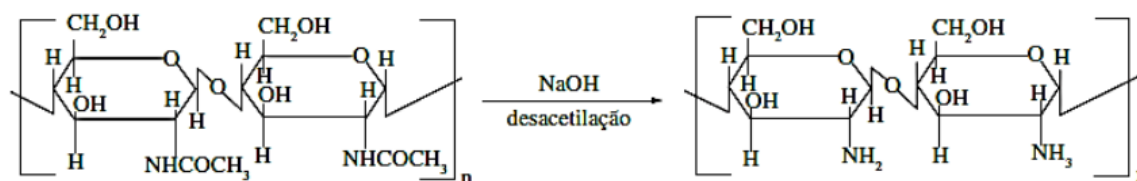


Figura 3- Representação molecular da quitina e quitosana (PANDEY *et al.*, 2017).

A Figura 4 mostra as etapas do processo de desacetilação química da quitosana predominantemente obtida por meio das cascas de crustáceos (CHANG *et al.*, 2015).

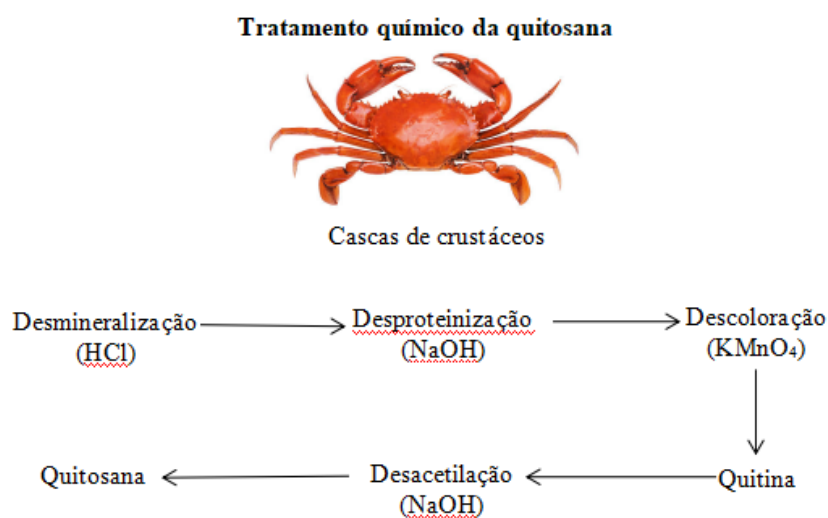


Figura 4- Representação esquemática da síntese de quitosana por método químico (MADNI *et al.*, 2021) com adaptações.

Este método envolve desmineralização, desproteínização, descoloração, e desacetilação. Nesse processo, as cascas dos crustáceos são desmineralizadas com o emprego de cloreto de hidrogênio e desproteínizadas com hidróxido de sódio para remover resíduos de minerais e proteínas, respectivamente. Em seguida, os tratamentos com óxido de potássio e manganês removem as moléculas pigmentadas, resultando em quitina límpida. Finalmente, a quitina é submetida a tratamento alcalino para formar quitosana (MADNI *et al.*, 2021).

A baixa solubilidade da quitina está diretamente relacionada com a estrutura altamente cristalina, caracterizando-a como um material hidrofóbico e insolúvel em água e em alguns solventes orgânicos comuns. A quitosana, produto desacetilado da quitina é insolúvel em água e solventes orgânicos, mas é solúvel em solução ácida como os ácidos fórmico, acético, láctico, pirúvico e oxálico, devido à presença de grupos amino livres em sua estrutura química, favorecendo a dissolução do material (SINGH;SHITIK;SINGH, 2017).

A essência do processo de dissolução da quitosana em ácido diluído é que o grupo amino em sua cadeia molecular se combina com os prótons do hidrogênio na solução aquosa, tornando-o um polieletrólito com carga positiva. Consequentemente, a existência de cátions destrói as ligações de hidrogênio originais entre as moléculas de quitosana e as faz se dissolver na água. A solubilidade da quitosana também é afetada por seu peso molecular e pelo grau de dasacetilação (DD). Em geral, quanto maior o DD da quitosana, maior o grau de protonação dos grupos amino na cadeia molecular e mais fácil de dissolver (WANG; XUE; MAO, 2020).

A quitosana é quimicamente mais ativa em relação a quitina, uma vez que possui grupamentos hidroxilas primários e secundários em cada unidade de repetição e o grupo amina em cada unidade desacetilada. Dessa maneira, esses grupos reativos estão relativamente propícios às modificações químicas que permitam alterações das propriedades mecânicas e físicas da quitosana (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017).

Muita atenção tem sido dada à quitosana, devido os efeitos benéficos das moléculas de quitosana no crescimento e proliferação das células tridimensionais, bem como na organização da deposição de colágeno, garantindo assim uma cicatrização rápida. Várias caracterizações físico-químicas, estudos citotóxicos *in vitro* e modelos de cicatrização de feridas provaram a eficácia potencial dos compostos de quitosana como substituto da pele em queimaduras e cicatrização de feridas (SHARMA E BATRA, 2019).

2.4.1 Propriedades biológicas da quitosana na cicatrização de feridas

A quitosana tem se destacado como um biomaterial eficiente para estimular a regeneração tecidual. Muitos estudos têm mostrado que a quitosana possui um conjunto de propriedades ideais para cicatrização de feridas, uma vez que é considerada um material atóxico, lentamente biodegradável e biocompatível (PATRULEA *et al.*, 2015).

Vários estudos confirmaram as propriedades antiinflamatórias da quitosana. MADNI *et al.* (2021) sugerem que a atividade antiinflamatória da quitosana se deve à presença de frações carregadas em sua estrutura, promovendo a inibição ou redução das reações pró-inflamatórias.

De acordo com o estudo de GAISLER *et al.* (2021) a membrana de quitosana estimulou precocemente a cicatrização de feridas abertas em ratos. Observou-se uma intensa cascata de eventos na fase inflamatória da ferida que diminuíram no 7º dia,

antecipando as fases subsequentes do processo de cicatrização evidenciados pela organização dérmica, queratinização e reepitelização. Esses efeitos benéficos da membrana de quitosana nas feridas foram relacionados ao aumento de fibroblastos e formação de colágeno, os quais são responsáveis pelo fechamento da ferida.

O estudo de TAMER *et al.* (2020) mostraram resultados promissores com as membranas produzidas com quitosana (Ch) e hialurona (HA) carregada com glutatona (GSH). Tais membranas atingiram uma cicatrização de feridas mais rápida quando comparadas ao grupo controle (gaze de algodão) observados em todas as fases de cicatrização que pode ser atribuída tanto ao papel do ambiente úmido no processo de cicatrização como na capacidade da glutatona na redução da fase inflamatória. Desse modo, as feridas tratadas com Ch / HA / GSH na pele em ratos cicatrizaram parcialmente após 7 dias.

O mecanismo de ação da quitosana na inibição do crescimento microbiano ainda não está totalmente definido, contudo vários estudos apresentam resultados similares; portanto, os pesquisadores formularam três hipóteses que estão interligadas: interações eletrostáticas acontecem entre quitosana catiônica e moléculas aniônicas na superfície da célula microbiana, o que pode levar à ruptura da parede celular e vazamento de componentes intracelulares, causando a morte celular; a quitosana pode penetrar na membrana celular e interagir com o DNA, interrompendo a síntese protéica; outro mecanismo de ação da quitosana seria a quelação de nutrientes e metais essenciais fundamentais para a estabilidade celular (MATICA *et al.*, 2019).

O peso molecular, grau de desacetilação, concentração de quitosana e pH da solução são alguns fatores que interferem na atividade antimicrobiana da quitosana. Por exemplo, no estudo de VILAR *et al.* (2016) a quitosana com alto peso molecular e grau de acetilação obteve melhor atividade antimicrobiana. Junto com isso, a atividade bactericida da quitosana também dependeu da hidrofiliabilidade e do conteúdo de frações carregadas negativamente presentes na membrana celular dos micróbios, pois as bactérias gram-negativas foram mais afetadas pela quitosana em comparação com as bactérias gram-positivas.

O desenvolvimento de curativos com potencial antimicrobiano torna-se importante devido às infecções em feridas que podem prolongar o processo de cicatrização. Por exemplo, no estudo de WANG *et al.* (2020) a membrana de quitosana incorporada com metal-orgânicas como Cu na membrana de ácido polivinílico (PVA) obtiveram ação

antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como aceleração da ferida com menos células inflamatórias e mais células fibroblásticas. Além disso, demonstrou propriedades biocompatíveis e de adesão celular, condições estas imprescindíveis para biomateriais de reparação tecidual.

Além disso, estudos demonstraram atividade antifúngica da quitosana. Foi mostrada no estudo de BASSERI *et al.* (2019) a atividade de inibição de quitosana sobre algumas espécies de fungos, provavelmente um dos mecanismos de ação fungicida da quitosana está relacionada com a penetração da molécula de quitosana dentro da parte das hifas do corpo do fungo, seguida pela ruptura da estrutura da enzima, que são essenciais para o crescimento do fungo.

MADNI *et al.* (2021) mostram em seus estudos a implicação da ação de substâncias prejudiciais ao corpo humano, como os radicais livres produzidos de forma contínua no nosso corpo, como superóxido de oxigênio, radical hidroxila e próton, provenientes de processos metabólicos, não são benéficos a várias biomoléculas, incluindo lipídios da membrana celular, proteínas citoplasmáticas e DNA. Para proteger o organismo contra esses efeitos nocivos dos radicais, os antioxidantes funcionam eliminando os íons, evitando sua produção ou decompondo a estrutura.

A quitosana e seus derivados podem reparar danos ao corpo, remover o excesso de radicais livres no corpo, aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e inibir a atividade de peroxidação lipídica, aumentando assim a capacidade antioxidante do corpo e os efeitos de retardamento do envelhecimento (WANG; XUE; MAO, 2020).

HASSAN *et al.* (2021) revelaram que a membrana de quitosana (Ch) e hialurona (HA) potencializada por fosfatidilcolina diidroquercetina (PCDQ) exibiram atividades antioxidantes, antimicrobianas e antiinflamatórias. Em comparação ao efeito da gaze de algodão e Ch / HA nas feridas mostrou menor largura de cicatriz, levou menos tempo para cicatrizar e apresentou notável reepitelização. Assim, podemos concluir que as membranas Ch / HA / PCDQ concebidas podem ser aplicadas para promover a cicatrização de feridas.

De acordo com o estudo de CHAUDHARI *et al.* (2016) a quitosana têm contribuição ativa para interromper o sangramento, uma vez que acelera a coagulação sanguínea natural, ativando as plaquetas, auxiliando desse modo na cicatrização mais rápida de feridas. Além do mais, estimula a proliferação de fibroblastos, a produção de citocinas por meio da ativação de macrófagos e angiogênese. Além disso, a quitosana

também promove a síntese e deposição de dois biomateriais importantes de ECM, incluindo o colágeno e ácido hialurônico no local da ferida. Por isso, muitos trabalhos mostram efeitos benéficos da quitosana na cicatrização de feridas, uma vez que estimula a hemostasia e regeneração do tecido (AHMED; IKRAM, 2016).

Durante a cicatrização de feridas cutâneas, a quitosana desempenha um papel na hemostasia, uma vez que é capaz de se ligar aos glóbulos vermelhos, o que permite a coagulação rápida do sangue. Conforme mostrou o estudo de HO *et al.* (2021) que ao aumentar as densidades de oligômeros de quitosana na membrana de policaprolactona acelerou a coagulação sanguínea quando comparada com a policaprolactona pura. Essa característica de indução plaquetária da quitosana torna-se uma boa coadjuvante no tratamento de feridas.

Foi demonstrado no estudo de VIVCHRENKO *et al.* (2020) a capacidade de regeneração do filme de quitosana com agarose como substituto de pele artificial, revelando alta capacidade de absorção de exsudato, altas deformações elásticas (módulo de Young comparável ao tecido da pele humana), biodegradação em ambiente de ferida enzimática simulada. Além disso, não causou toxicidade no organismo, ofereceu suporte ao crescimento e proliferação de fibroblastos de pele humana. Por apresentar todas as características necessárias do substituto cutâneo pode ser potencialmente utilizado na medicina regenerativa.

2.5 ÓLEO DE COPAÍBA

2.5.1 Plantas do gênero *Copaífera spp.*

A relevância de plantas com propriedades antimicrobianas e potencial bactericida tem sido alvo de diferentes pesquisadores. A copaíba (*tupy cupa-yba*), uma árvore nativa brasileira do gênero *Copaífera spp.* pertencente a família botânica *Leguminosae* (PASCOAL *et al.*, 2020). PIERRE *et al.* (2009) mostram que as árvores de copaibeiras crescem lentamente e podem atingir até 40 metros de altura e duram aproximadamente 400 anos.

As copaibeiras são encontradas em regiões tropicais da América latina e África ocidental e possuem relevância na Medicina Natural Brasileira (DIAS *et al.*, 2021). O óleo resina consiste em um produto do metabolismo secundário das plantas e defende a planta contra animais, fungos e bactérias (ABRÃO *et al.*, 2021). A Figura 5 mostra a árvore de *Copaífera spp.*



Figura 5- Árvore de *Copaifera* spp. (PIERI; MUSSI; NOGUEIRA, 2009).

A extração do óleo através da perfuração no tronco da copaibeira é considerada uma prática não agressiva, que consiste em perfurar o tronco com uma broca de aproximadamente 2 centímetros de diâmetro em dois furos. A primeira deve ser feita 1 metro acima da base da planta e a segunda de 1 a 1,5 metros acima da primeira. O óleo escoar por meio de um tubo de PVC inserido nos orifícios, reservando-os (PIERI; MUSSI; NOGUEIRA, 2009). Na Figura 6 é mostrada a técnica de coleta do óleo de copaíba.



Figura 6- Extração do óleo de copaíba. (PIERI; MUSSI; NOGUEIRA, 2009).

Além disso, este óleo pode ser considerado um recurso natural renovável. O óleo resina contém misturas de fração volátil sesquiterpenos e diterpenos e fração resinosa que diferem entre as espécies. Diversos estudos legitimam suas propriedades

analgésicas, antiinflamatórias, propriedades antitumorais e atividade antibiótica e curativa (MARANGON *et al.*, 2017).

Segundo PASCOAL *et al.* (2020) o resultado obtido do óleo resina de copaíba na regeneração de tecidos, como o carregamento de compostos com atividades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antibacterianas, como os encontrados óleo resina de copaíba, em matrizes poliméricas apresenta diversas vantagens em relação ao processo de cicatrização do tecido.

2.5.2 Componentes bioativos do óleo de copaíba

A partir de 1972, Food Drug Administration (FDA) reconheceu a oleorresina de copaíba como um medicamento fitoterápico, uma vez que existem descritos na literatura diversas aplicações etnofarmacológicas importantes relacionadas principalmente a ação anti-inflamatória (MARAGON *et al.* 2017; BECKER *et al.*,2020).

As resinas de copaíba são geralmente compostas de um óleo volátil composto em grande parte por hidrocarbonetos sesquiterpênicos, como β -cariofileno, α -copaeno, β -elemeno, α -humuleno e germacreno D. Além disso, a oleorresina também é composta de vários ácidos diterpênicos biologicamente ativos, incluindo ácido copálico, ácido caurenóico, ácido alepterólico e ácido polialítico (TRINDADE, SILVA; SETZER, 2018). A Figura 7 mostra algumas estruturas químicas principais do óleo de copaíba envolvidas na atividade anti-inflamatória.

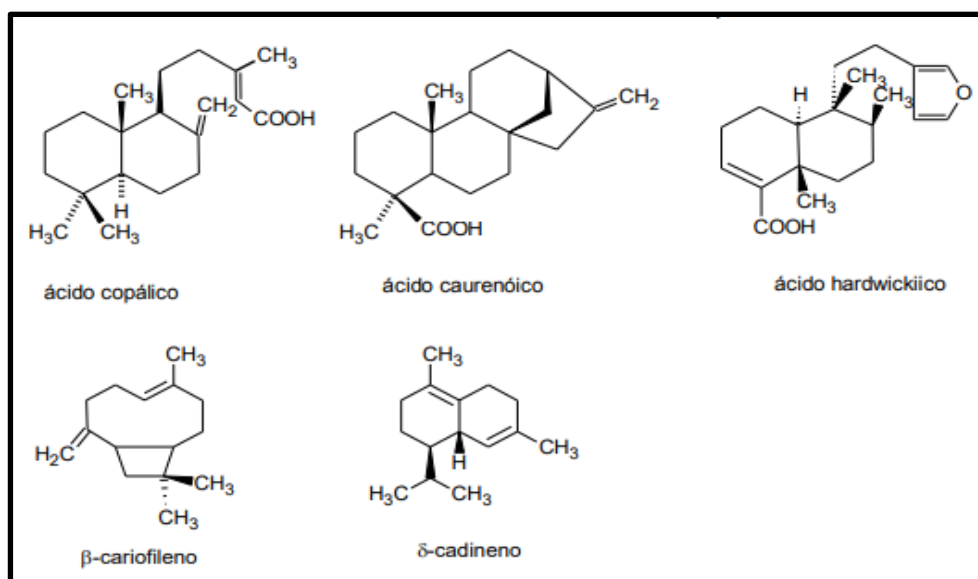


Figura 7- Estruturas químicas da copaíba com atividade antimicrobiana (MARANGON *et al.*, 2017).

Estudos mostram que o principal composto bioativo da oleorresina de copaíba, β -cariofileno, exibe atividades anti-inflamatórias evidentes. Como foi verificado no estudo de PASCOAL *et al.* (2020) que detectaram o β -cariofileno no oleorresina de copaíba e lupeol no extrato de folha, ambos com ação anti-inflamatória, que foram impregnados com sucesso em curativos de gelatina tridimensionais e, principalmente obtiveram a preservação das estruturas químicas dos compostos de copaíba e a organização da matriz polimérica de gelatina. Com isso, a incorporação do óleo de copaíba à base de polímeros pode ser aplicado na cicatrização de feridas.

Os efeitos benéficos do óleo essencial de copaíba administrados oralmente foi constatado no estudo de AMES-SIBIN *et al.* (2018) ao investigar a ação do β -cariofileno, o principal constituinte do óleo de copaíba, na inflamação sistêmica, no estado oxidativo e no metabolismo das células do fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante, um modelo para artrite reumatóide. Observou-se redução de edema da pata, dos gânglios linfáticos e número de leucócitos circulantes e articulares. Além disso, restaurou os níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e reduziu a glutatona no fígado artrítico. Esses resultados revelam que o β -cariofileno é possivelmente responsável pelas ações anti-inflamatórias e oxidantes do óleo de copaíba.

2.5.3 Atividades biológicas do óleo de copaíba

A oleorresina de copaíba em sua forma natural é conhecida por induzir a síntese pró-inflamatória de fatores de crescimento, como o TGF- α , um importante estimulador da síntese da matriz extracelular (PASCOAL *et al.*, 2020).

Nos estudos de VIEIRA *et al.* (2008) o efeito no tratamento tópico com óleo-resina de copaíba na incisão cirúrgica em camundongos para implante de vidro no tecido subcutâneo prejudicou o processo de reparação natural da ferida. Foi evidenciado no estudo macroscópico que a ferida apresentou características inflamatórias mais intensas como hiperemia, edema e crostas que persistiram até o sétimo dia do processo. Além disso, microscopicamente não havia reepitelização completa demonstrado pela desorganização do tecido cicatricial. Diante desses resultados o uso direto do óleo de copaíba em feridas na presença de corpo estranho prolongou a cicatrização da ferida.

Por outro lado BECKER *et al.* (2020) demonstraram que a formulação tópica contendo oleorresina de copaíba apresentaram efeitos antinociceptivos e

antiinflamatórios em camundongos que sofreram queimadura na pele induzida por radiação UVB. Dessa forma, observou-se a eficiência da aplicação tópica do óleo-resina de copaíba para o tratamento da dor inflamatória diante de queimaduras provocadas pelo sol.

Todavia, para diminuir os efeitos deletérios do óleo de copaíba, muitos estudos mostram que o óleo de copaíba pode ser usado por meio do contato indireto através de suporte polimérico com concentrações menores desses compostos bioativos. Alguns autores da literatura demonstram que o óleo de copaíba e quitosana aceleram o processo de cicatrização de feridas *in vivo* (PASCOAL *et al.*, 2020).

As oleorresinas de *copaífera* mostraram atividades biológicas, muitas das quais foram atribuídas aos ácidos diterpenóides. Geralmente, as oleorresinas de *copaífera* e seus constituintes diterpenóides apresentam atividades antibacteriana, antiinflamatória, anti-leishmania, antiproliferativa, antitripanossômica e cicatrizante (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018).

Dentre as possíveis aplicações do óleo de copaíba consiste a terapia periodontal não cirúrgica para o controle da infecção periodontal microbiana removendo o biofilme bacteriano, cálculo e toxinas de superfícies radiculares periodontalmente existentes (DIAS *et al.*, 2021). Nesse contexto, o óleo de copaíba constitui uma boa alternativa para o direcionamento de microorganismos resistentes a antibióticos.

Os resultados do estudo de OLIVEIRA *et al.* (2020) mostraram que o óleo natural de copaíba apresentou atividade antimicrobiana contra os isolados multirresistentes de mastite bubalina, com notável inibição ao crescimento de *Staphylococcus aureus* na concentração do óleo de 6,25%, considerada concentração bactericida mínima. Portanto, o óleo de copaíba é uma alternativa eficaz como uma nova terapêutica antimicrobiana contra patógenos com alta resistência causadores de mastite bubalina.

2.5.4 Efeito do óleo de copaíba no tratamento de leishmaniose

O óleo de copaíba vem sendo usado como uma nova terapêutica no tratamento de doenças infecciosas reemergentes, como por exemplo a leishmaniose, considerada um problema sério de saúde pública da América Latina, devido elevada incidência (SERENO *et al.*, 2007; MAZUR *et al.*, 2019).

A leishmaniose são doenças parasitárias causadas por protozoário da espécie leishmania transmitida tipicamente pelo flebotomíneo fêmea durante a hematofagia,

mas podem ocorrer por transmissão congênita ou por via sanguínea (DESJEUX,1996; CLEN, 2010). A doença pode ser classificada em leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral, também conhecida como Kalazar (CLEN, 2010) .

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou cutânea (Figura X) pode ser manifestada por meio de úlceras únicas ou formas disseminadas que podem inclusive acometer as mucosas (MAZUR *et al.*; 2019). Estima-se que ocorra 2 milhões de casos novos por ano (1,5 milhões para leishmaniose cutânea e 500.000 para leishmaniose visceral) e que 12 bilhões de pessoas estão infectadas globalmente (OMS, 2010).

Há poucas alternativas terapêuticas para o tratamento desta patologia, e os tratamentos disponíveis podem induzir efeitos colaterais sérios ao paciente, além do custo alto e desenvolvimento de resistência do patógeno à terapia medicamentosa (PASSERO *et al.*, 2021; SERENO *et al.*, 2007). Por isso, a necessidade de encontrar uma nova terapêutica eficaz e de baixo custo para tratar a leishmaniose.

As plantas são fontes inesgotáveis de princípios bioativos que precisam ser investigadas como drogas antiparasitárias, incluindo a leishmaniose (MORAES *et al.*, 2018). O uso do óleo de copaíba por via oral ou tópica no tratamento de leishmaniose são relatados em diversos estudos (SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012 MORAES *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2013).

Em 2008, SANTOS e colaboradores, avaliaram atividade leishmanicida do óleo de copaíba de diferentes espécies de copaífera e mostraram ação eficaz na forma promastigotas de *L.amazonensis* e sem risco de causar efeitos tóxicos. Estudos posteriores mostraram que o tratamento oral com óleo de copaíba reduziu significativamente o tamanho médio da lesão de uma pata de um camundongo infectado pela *L. amazonensis*, além do efeito similar ao tratamento com glucantime administrado por via intramuscular e, mostrou uso seguro devido não ter induzido toxicidade e nem tão pouco genotoxicidade (SANTOS *et al.*, 2011). Esses achados são similares aos resultados encontrados por SANTOS *et al.* (2012), que detectaram danos extensos nas mitocôndrias e aumento da permeabilidade da membrana plasmática do parasita leishmania ao ser tratados com óleo de copaíba.

MORAES *et al.* (2018) desenvolveram um tratamento oral à base de nanoemulsões do óleo de copaíba e andiroba contra infecções causadas por leishmaniose visceral e

cutânea em camundongos e mostraram redução dos níveis de infecções, carga parasitária, tamanho da lesão e melhora das características histopatológicas.

Resultados satisfatórios também foram encontrados no estudo de RODRIGUES *et al.* (2018) na obtenção de nanoemulsão do óleo de copaíba como agente anti-leishmania, mostrando que tanto o óleo bruto de copaíba e α -copaena inibiram o crescimento do protozoário leishmania, com maior atividade antiparasitária da nanoemulsão α -copaena. Foram observados no estudo de SOARES *et al.*, (2013) que quatro diferentes tipos de óleos de copaíba comerciais apresentaram capacidade antileishmania, e o cariofileno como a principal molécula presente nos óleos que podem ser eficaz no desenvolvimento de fármaco para o tratamento de leishmaniose.

Mediante a esses dados, é possível supor que a membrana de quitosana com o óleo de copaíba pode ser usada como biocurativo com efeito seguro em lesões produzidas por leishmaniose tegumentar. No entanto, estudos são necessários para elucidar os benefícios dessa composição no tratamento tópico antileishmania.

2.5.5 Efeito do óleo de copaíba na cicatrização de feridas

Além da atividade antiparasitária comprovada do óleo de copaíba, outro aspecto importante a ser analisado é quanto ao efeito cicatrizante do óleo em feridas cutâneas. Umás séries de estudos comprovam a ação do óleo de copaíba no processo de cicatrização de feridas (PAIVA *et al.*, 2002; CAVALCANTI NETO *et al.*, 2005; MARTINI *et al.*, 2016; DIAS *et al.* 2017). Todavia, faz necessário mais pesquisas para confirmação da eficácia e segurança do óleo de copaíba na cicatrização de feridas.

A investigação da atividade cicatrizante do óleo de copaíba foi avaliada em modelos de ratos experimentais através de uma ferida excisadas. A aplicação tópica do óleo acelerou a contração da ferida e aumentou a resistência à tração quando comparados com grupos não tratados, evidenciando a capacidade do óleo na cicatrização segura e eficaz da ferida (PAIVA *et al.*, 2002).

A influência do óleo de copaíba na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos foram analisados e comparados histologicamente com outros tratamentos. O tratamento tópico com o óleo de copaíba, clorexidina e soro fisiológico ocorreram durante 15 dias com duas aplicações diárias. Os resultados evidenciaram que a epitalização completa das lesões cutâneas foram observadas a partir de 7 dias com o óleo de copaíba, apesar de efeito cicatricial semelhante no início e final entre os demais tratamentos, embora o óleo

apresentou uma reparação do tecido conjuntivo mais lento (CAVALCANTI NETO *et al.*, 2005).

O fechamento de uma ferida no dorso de ratos foi avaliado pela histologia e macroscopia após tratamento diário com óleo de copaíba comparando com nitrofurazona e solução fisiológica. Foi observado que o fechamento da ferida ocorreram em 14 dias em ambos os tratamentos, embora a solução salina proporcionou um fechamento mais rápido na fase inicial, no entanto a quantidade de fibras colágenas e elásticas foram maiores no óleo de copaíba e nitrofurazona (MARTINI *et al.*, 2016).

A propriedade cicatrizante do óleo de copaíba foi comprovada na lesão da córnea induzida quimicamente em ratos. O colírio formulado com óleo de copaíba influenciaram na reparação corneana, reduziram os sintomas associados às úlceras de córnea e não exerceram efeitos tóxicos ou genotóxicos nos animais experimentais, o que pode ser justificado sua aplicação no tratamento de ceratite superficial química com segurança e baixo custo (DIAS *et al.* 2017).

A cicatrização de feridas, por segunda intenção, foi avaliada após tratamento tópico com óleo de copaíba na ressecção da pele em ratos. Observou influência do óleo na velocidade da contração da ferida principalmente no início da cicatrização, reação inflamatória mínima e presença de fibras colágenas do tipo I responsáveis pela proliferação de fibroblastos e formação de matriz extracelular conferindo uma melhor qualidade na cicatrização da ferida (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2019).

A eficácia do óleo de copaíba foi comprovada para tratar as feridas tanto como os produtos convencionais, porém mais vantajosas devido melhor aparência na cicatriz da ferida, efeitos anti-inflamatórios e por ser um produto natural de acesso fácil e custo reduzido.

Há na literatura poucos estudos envolvendo a produção de filme do óleo de copaíba com quitosana para tratamento de feridas. Um estudo recentemente publicado por DEBONE *et al.* (2019) utilizaram duas concentrações do óleo de copaíba (0,1 e 0,5 %p/p) para duas concentrações de quitosana (1 e 2%). Concluíram em suas pesquisas que os filmes de quitosana/óleo de copaíba potencializaram propriedades de barreira e resistência.

MARANGON *et al.* (2017) desenvolveram em seus estudos emulsões formuladas com óleo de copaíba incorporado à quitosana e gelatina. Observaram baixa toxicidade e atividades bactericidas contra infecções por *Staphylococcus aureus*. Nesse sentido, a

formulação por emulsão pode ser pesquisada com uma nova estratégia para o desenvolvimento de materiais à base do óleo de copaíba para controlar infecções de pele.

2.5.6 Uso seguro do óleo de copaíba

O uso da oleorresina de copaíba surge como tratamento alternativo natural eficaz na redução da inflamação, aceleração do reparo tecidual e sem causar efeitos nocivos ao organismo. No entanto, devido à diversidade de espécies e composição química diversificada, mais estudos são necessários para avaliação do uso seguro e eficaz desse óleo.

No estudo de TEIXEIRA *et al.* (2017) evidenciaram que a administração oral do óleo resina de copaíba em camundongos não causou toxicidade, demonstrando o uso seguro desse extrato. Assim como, observou uma redução do processo inflamatório na lesão transfixante na língua dos ratos. Tal reparação no tecido lesado, pode estar associada ao elevado teor de β -cariofileno presente no óleo de copaíba.

ALVARENGA *et al.* (2020) comprovaram o tratamento seguro do óleo resina de copaíba na reparação de tecidos na mucosa oral, pois não foram observados danos hepáticos e renais no organismo dos ratos. Observaram também redução do infiltrado inflamatório, maiores índices de reepitelização e melhor organização da deposição das fibras colágenas quando comparadas com o grupo tratado com corticóide.

Estudos *In vitro* realizado por VEIGA *et al.* (2007) observaram que não houve efeito tóxico do óleo resina de copaíba em células de macrófagos em concentrações mais baixas, no entanto em concentração maior causou toxicidade celular. Afirmam ainda que o tratamento oral com óleo resina de copaíba apresentou ação anti-inflamatória nas espécies estudadas, com o efeito mais potente na espécie com maior concentração de β -cariofileno, no qual os estudos relacionam como o principal composto ativo responsável pela inibição do processo inflamatório.

AMES-SIBIN *et al.* (2018) relataram que o tratamento oral com β -cariofileno melhoraram o processo inflamatório em ratos artríticos reduzindo edema de pata, o aumento dos gânglios linfáticos, e o número de leucócitos circulantes e articulares. Por isso, a atividade anti-inflamatória do óleo resina de copaíba pode ser atribuída ao β -cariofileno presente na composição do óleo.

Contrariamente, no estudo de FEITOSA *et al.* (2018) o uso tópico do óleo de copaíba em feridas cirúrgicas na bexiga em ratos não favoreceu o processo de cicatrização, ao invés disso, aumentou a fase inflamatória local, retardando dessa maneira a fase proliferativa e conseqüentemente prolongando a cicatrização. Foi constatado que o tratamento local com óleo de copaíba aumentou a quantidade de macrófagos e a proliferação vascular que desempenham um papel importante na modulação do processo inflamatório, ou seja, não contribuiu no fechamento precoce da ferida.

No entanto, neste estudo houve avaliação da cicatrização apenas no 7º dia de pós-operatório, pois o objetivo do estudo era avaliar a fase inflamatória aguda, desse modo não foi realizado o estudo da cicatrização completa da ferida operatória como uma maneira de comparação do efeito anti-inflamatório do óleo de copaíba.

Baseados nos achados de SILVA *et al.* (2013), houve aumento da neoformação óssea observado em ambos os grupos tratados com óleo de copaíba quando comparados ao grupo placebo. Pode-se concluir que a administração tópica ou sistêmica do óleo de copaíba leva a uma melhor cicatrização do osso alveolar, porém a aplicação tópica no tecido conjuntivo deve ser considerada com cautela, no que diz respeito à cicatrização de todo alvéolo.

2.5.7 Nanoemulsão do óleo de copaíba

Nanoemulsões são formulações obtidas por pelo menos dois líquidos imiscíveis e cineticamente estáveis com emulsificantes, que levam a redução extrema do tamanho das gotas em 20 a 400nm (RIBEIRO *et al.*, 2020). A tecnologia de nanoemulsão vem sendo amplamente pesquisada como sistema de liberação de fármacos aplicáveis em diversas formas farmacêuticas.

PIRES e MOURA (2017) mostram que existem duas regiões nas partículas de nanoemulsões constituída por uma parte hidrofóbica (lipofílica) que interage com o óleo e uma parte hidrofílica que interage com a água durante sua formação. Na Figura 8, é representada a partícula de nanoemulsão na qual as moléculas do tensoativo (Tween 80) estão organizadas na interface óleo/água através das interações ocorrentes entre suas regiões: hidrofóbica (apolar) com o óleo (apolar) e hidrofílicas (polar) com a água (polar).

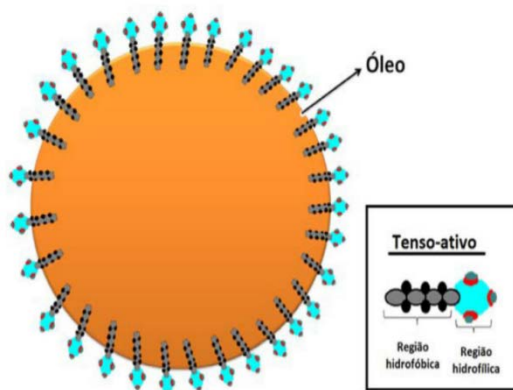


Figura 8- Representação da partícula da nanoemulsão (PIRES; MOURA,2017).

De acordo com o estudo de ALENCAR *et al.* (2015) o sistema de emulsão nanoestruturado com óleo resina de copaíba apresentou melhores resultados antimicrobianos contra fungos e bactérias causadoras de infecções de pele, assim como contribuiu na inibição efetiva da formação de biofilmes. Contudo, o óleo essencial de copaíba exibiu melhores atividades inibitórias antimicrobianas. Tal ação eficaz baseia-se na dispersão do óleo em gotas, o que pode melhorar as atividades da composição química e dessa maneira potencializar os efeitos dos óleos naturais. Logo, essas formulações são alternativas importantes para tratamento de infecções desencadeadas por diversos microorganismos patogênicos.

Os óleos vegetais são importantes fontes de agentes bioativos com atividades antimicrobianas. Têm-se destacado como matéria-prima no desenvolvimento de produtos farmacêuticos com potencial efeito no sistema de liberação gradativa do óleo em nanoemulsões. Tal assertiva foi evidenciada no estudo de MORAES *et al.* (2018) comprovando atividades leishmanicidas no tratamento com nanocopaíba e nanoandiroba em camundongos infectados com leishmaniose, com resultados benéficos quanto a redução da carga parasitária no baço e fígado, diminuição do tamanho da lesão, melhora das características histopatológicas e conseqüentemente melhora da infecção. Dado à resistência primária ao tratamento convencional da leishmaniose humana, as nanoemulsões do óleo de copaíba podem ser uma fonte escolhida para prevenir ou curar doenças parasitárias.

A nanoemulsão da oleoresina de copaíba surge como uma solução da solubilidade do óleo em água, tornando-a uma formulação eficaz e viável no desenvolvimento de produtos aplicáveis nas diversas áreas. Pode-se destacar bons resultados farmacológicos no estudo de RODRIGUES *et al.* (2014) com ação inseticida contra larvas de *Aedes*

aegypti a partir da nanoemulsão do óleo de copaíba. Esse estudo mostra os benefícios das nanoemulsões do óleos vegetais como agentes larvicidas, portanto o estudo sugere que o óleo de copaíba nanoestruturado pode ser uma alternativa natural no controle da dengue.

Na concepção de RODRIGUES *et al.* (2018) o uso da nanotecnologia vem sendo utilizado na área médica como alternativa promissora no tratamento de diversas doenças. Neste ramo, os produtos vegetais naturais são bastante pesquisados, principalmente os óleos provenientes da composição das plantas, transformando-as em nanopartículas que irão melhorar suas propriedades físico-químicas e biológicas.

As nanoemulsões são formulações de sistemas óleo com tamanho de gota extremamente pequeno, na faixa de 20-500nm, com características interessantes como boa espalhabilidade e umectação que podem ser utilizados em diversas áreas, como a cosmética, farmacêutica e como sistema de entrega de medicamentos (ROCHA-FILHO *et al.*, 2014).

Para PIRES (2016) os óleos naturais podem funcionar como material bioativo no tratamento de feridas a partir de seus componentes, por isso é fundamental a incorporação destes óleos essenciais no curativo. Entretanto, a característica hidrofóbica desses óleos dificulta a incorporação em materiais poliméricos. Para isso, a conversão do óleo de copaíba em tamanhos nanométricos através de nanoemulsões desses óleos pode melhorar a capacidade de interação com a matriz polimérica.

O β -cariofileno é o componente mais importante do óleo de copaíba, devido à alta capacidade de ação nos mecanismos anti-inflamatórios. A partir da formulação por nanoemulsão dessa oleorresina, de caráter untuoso, torna-se capaz de transformar sua porção hidrofílica mais aceitável e pode melhorar a penetração do β -cariofileno na pele devido ao menor tamanho da gota e à alta superfície de contato proporcionada pelas nanoemulsões (LUCCA *et al.*, 2015).

Existem vários métodos de nanoemulsão do óleo de copaíba para melhorar a absorção na pele do seu produto e de seus compostos. Neste caso, o estudo de LUCCA *et al.* (2015) produziu uma nanoemulsão do óleo de copaíba com maior capacidade de penetração na pele quando comparada ao óleo bruto de copaíba pelo método novo livre de solvente por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa. Isso mostra que a escolha do melhor método de nanoemulsão contribui para melhorar a

funcionalidade do óleo de copaíba e seu principal componente, cariofileno, nas estruturas mais profundas da pele.

No estudo de ALENCAR et al. (2015) foi evidenciado que as emulsões nanoestruturadas, foram capazes de melhorar as atividades antimicrobianas dos óleos originais, mesmo contendo apenas 5% (p / p) do óleo em sua formulação, mostrou sua importância na preservação e aumento da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba.

A investigação dos benefícios oriundos do óleo de copaíba como cicatrizante faz-se necessário, visto que materiais de curativos à base de plantas medicinais podem ser uma opção no tratamento de feridas.

Esta etapa do trabalho abordou as principais fontes de pesquisa atuais que ofereceram embasamento teórico sobre o assunto abordado. Foram descritos os principais temas relacionados com a proposta do estudo que contribuíram para abrangência do conhecimento atual.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados na obtenção das membranas, por emulsão e nanoemulsão, estão apresentados no Quadro 2.

Quadro2: Descrição dos materiais utilizados para a síntese das membranas no estudo.

Material	Descrição	Marca/Fornecedor
Quitosana em pó	Chemical Abstracts Service (CSE): 9012-76-4; Grau de desacetilação de 75 a 85% e médio peso molecular 190.000-310.000 DA.	Sigma/Aldrich (São Paulo, Brasil)
Ácido acético glacial	Puro, Peso molecular 60,05 Gmol	Êxodo Científica (São Paulo, Brasil)
Solução de hidróxido de sódio a 5%	Peso molecular 40 Gmol	Êxodo Científica (São Paulo, Brasil)
Óleo de copaíba	Líquido viscoso; cor amarelado, odor característico de madeira; densidade: 0,912 g/ml; Índice de refração: 1,5; Ausência de nível de acidez (mgKOH/g); insolúvel em água.	Amazon Oil (Belém, Brasil)
Polisorbato (Tween 80)	Chemical Abstracts Service (CSE): 9005-65-6	Êxodo Científica (São Paulo, Brasil)

3.2 SÍNTESE DA EMULSÃO DO ÓLEO

3.2.1 Preparação da solução de quitosana

A solução de quitosana foi preparada utilizando 1g de quitosana em pó dissolvido em uma solução de 1%(v/v) de ácido acético. A solução foi mantida em agitador magnético em piro-cerâmica TMA 10C, da marca Thelga, por 24 horas, em meio ambiente para completa homogeneização da solução.

3.2.2 Preparação da emulsão do óleo de copaíba

A emulsão do óleo de copaíba foi preparada adicionando o óleo diretamente na solução de quitosana, de acordo com as quantidades do óleo para cada formulação (0,1%, 0,5%, 1,0% e 5,0% v/v).

3.2.3 Preparação das membranas de quitosana por emulsão do óleo de copaíba

Para a obtenção das membranas de quitosana por emulsão do óleo de copaíba, foi utilizado o método de evaporação de solvente, de acordo com o modelo proposto por DEBONE *et al.* (2018), com adaptações.

As membranas sintetizadas, por emulsão do óleo, são exibidas na Figura 9.

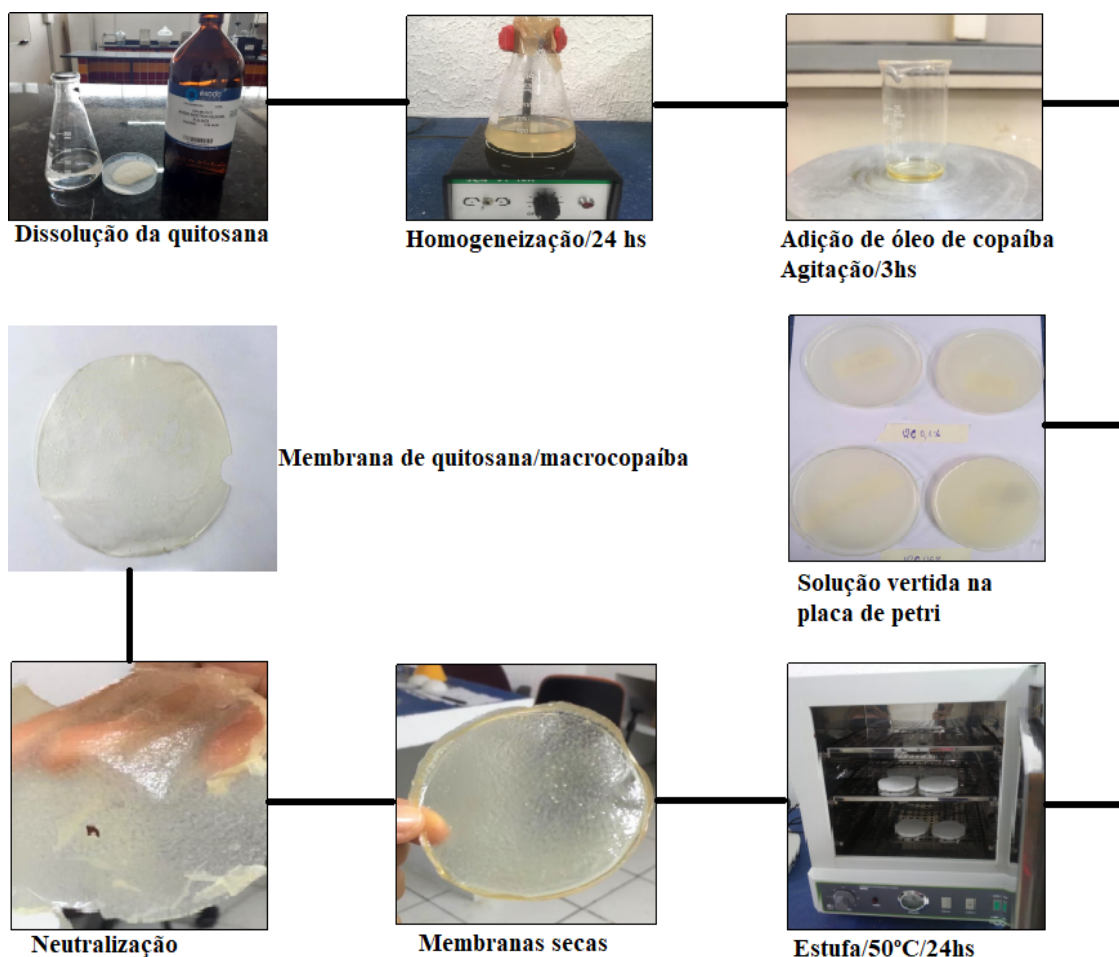


Figura 9- Diagrama esquemático da síntese da membrana de quitosana por emulsão do óleo de copaíba.

Após a solubilização da quitosana, o óleo de copaíba foi adicionado na solução e emulsionado sob agitação por mais três horas e, em seguida vertidas em placas de petri de poliestireno (8x8 cm), e, posteriormente, acondicionada em estufa a 50 ° C por 24 horas para a evaporação do solvente e formação da membrana. Após a etapa de secagem, as membranas foram retiradas da estufa e lavadas com uma solução de hidróxido de sódio 5%(v/v) por 2 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas abundantemente em água e estiradas em recipientes para secagem durante 24 horas à temperatura ambiente.

Foram produzidas quatro (4) membranas de quitosana em diferentes concentrações do óleo de copaíba e outra membrana de quitosana sem o óleo. As composições das membranas, sintetizadas por emulsão do óleo de copaíba, bem como as denominações (siglas) correspondentes a cada uma delas, estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3- Descrição das siglas e composições de cada membrana sintetizadas por emulsão do óleo no estudo.

Sigla	Componentes	Descrição das membranas
MQ	Quitosana em pó	1g de quitosana dissolvida em 100mL de água destilada e 1% ácido acético (solução de quitosana)
MQCo-0,1	Quitosana+ 0,1 mL de copaíba	Solução de quitosana + adição direta de 0,1 mL do óleo de copaíba
MQCo-0,5	Quitosana+ 0,5 mL de copaíba	Solução de quitosana+ adição direta de 0,5 mL do óleo de copaíba
MQCo-1,0	Quitosana+ 1,0 mL de copaíba	Solução de quitosana + adição direta de 1,0 mL do óleo de copaíba
MQCo-5,0	Quitosana+ 5,0 mL de copaíba	Solução de quitosana + adição direta de 5,0 mL do óleo de copaíba

3.3 SÍNTESE DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO

3.3.1. Preparação da nanoemulsão do óleo

A síntese das nanoemulsões foram preparadas utilizando 90 mL de água destilada, 5 mL de Polisorbato e 5 mL do óleo de copaíba. O polisorbato foi dissolvido na fase oleosa (óleo de copaíba) e posteriormente adicionado à água (gota a gota), mantido a mistura em agitador magnético, por 20 min, em temperatura ambiente, e submetido a agitação ultrassônica por 10 minutos, usando um sonicador de ponta Vibra Cell Sonics 20 kHz com potência máxima de 750 W.

3.3.2. Preparação das membranas por nanoemulsão do óleo

Para obtenção das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba foi utilizado o método de emulsificação do óleo em água com surfactante, por agitação ultrassônica, para transformar as gotículas do óleo em escala nanométrica, e assim, melhorar a interação com a quitosana. O experimento foi baseado nas metodologias relatadas por SUGUMAR; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN (2015) e RODRIGUES *et al.* (2014), com algumas adaptações no estudo em questão.

As etapas de preparação das membranas por nanoemulsão do óleo de copaíba na quitosana são mostradas na Figura 10.

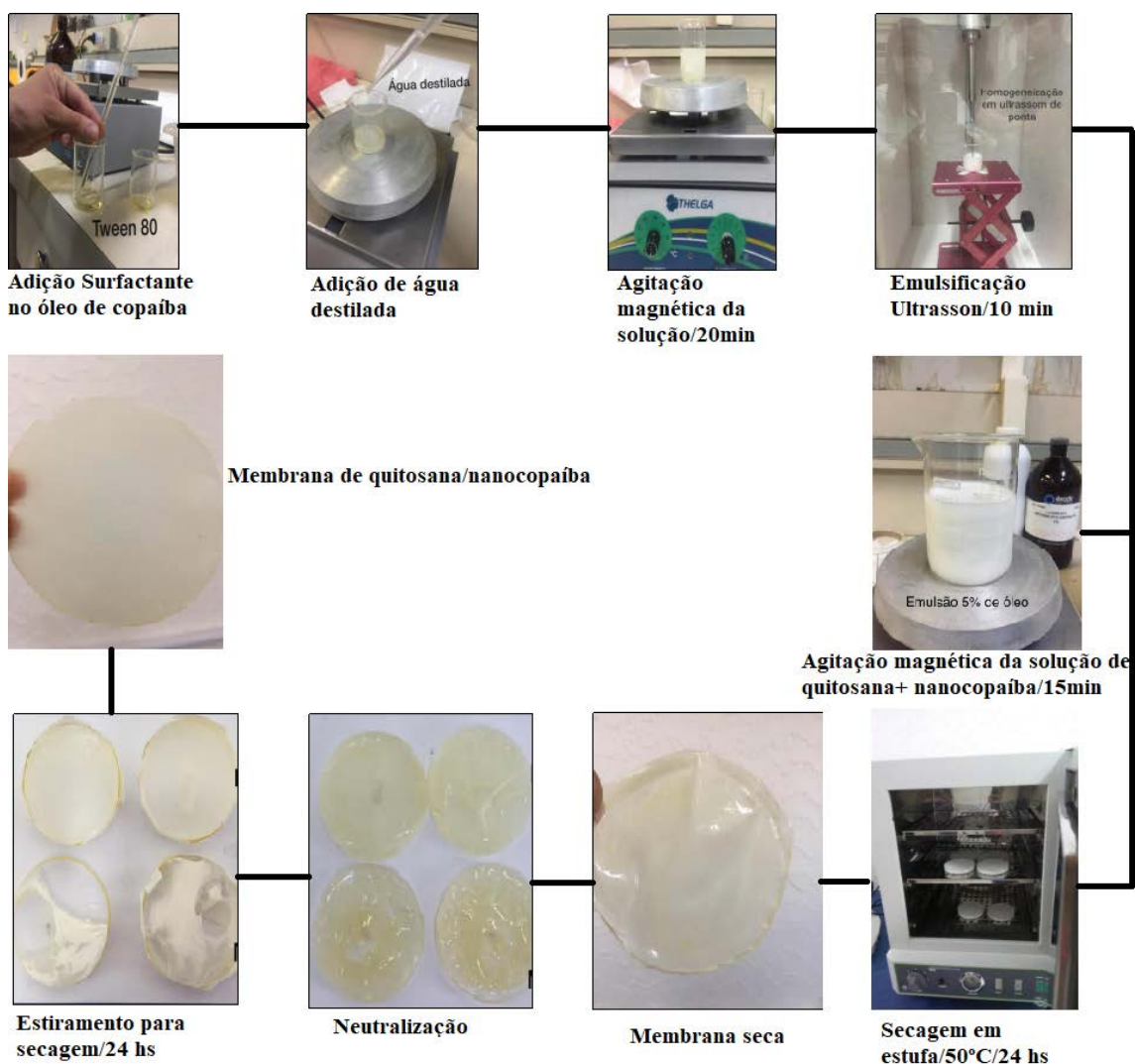


Figura 10: Diagrama esquemático da síntese da membrana de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba.

Após a adição do surfactante em óleo e da adição da água, a emulsão sofreu agitação constante e em seguida foi submetida a agitação ultrassônica. A emulsão foi misturada à solução de quitosana em agitação magnética, por mais 15 minutos, em temperatura ambiente. As etapas seguintes seguem a metodologia descrita no item 3.2.

Foram produzidas quatro (4) membranas de quitosana em diferentes concentrações de emulsificação ultrassônica do óleo de copaíba. As composições das membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo de copaíba, bem como as denominações (siglas) correspondentes a cada uma delas, estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4- Descrição das siglas e composições de cada membrana sintetizadas por nanoemulsão do óleo de copaíba no estudo.

Sigla	Componentes	Descrição das membranas
MQCoN-0,1	Quitosana + 0,1 mL de copaíba + 0,1 mL de polissorbato+ de água destilada	Solução de quitosana + 1,8 mL da nanoemulsificação do óleo
MQCoN-0,5	Quitosana + 0,5 mL de copaíba + 0,5 mL de polissorbato+ água destilada	Solução de quitosana + 9 mL da nanoemulsificação do óleo
MQCoN-1,0	Quitosana + 1,0 mL de copaíba + 1,0 mL de polissorbato + água destilada	Solução de quitosana + 18 mL da nanoemulsificação do óleo
MQCoN-5,0	Quitosana + 5,0 mL de copaíba + 5,0 mL de polissorbato + água destilada	Solução de quitosana + 90 mL da nanoemulsificação do óleo

As nanoemulsões foram preparadas no Laboratório de Física da Universidade Federal do Pará, Campus Guamá, Belém-Pará.

3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA

A composição química dos constituintes voláteis do óleo de copaíba foi analisada por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), em sistema Shimadzu QP Plus-2010 equipado com coluna capilar de sílica DB-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 m de espessura do filme) e utilizado gás de arraste.

A identificação dos componentes voláteis foi baseada no índice de retenção linear (IR) calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos injetados nas mesmas condições das análises, e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, por comparação destes com amostras autênticas existentes nas bibliotecas do sistema de dados e da literatura.

Este ensaio foi realizado no laboratório Adolpho Ducke (LAD) do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém-PA, Campus Guamá, UFPA.

3.5 TESTE DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)

O tamanho médio das gotículas e a distribuição de tamanho da suspensão coloidal ou índice de polidispersividade das nanoemulsões formuladas, foram determinados através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* –

DLS), através do analisador da marca NanoBrook Omni (*Brookhaven Instruments Corporation, New York, USA*).

As nanoemulsões preparadas e testadas por DLS, compostas de água destilada, polisorbato e óleo de copaíba, foram analisadas quanto à sonicação e sem sonicação, conforme descrição no Quadro 5.

Quadro 5- Descrição da composição das membranas por nanoemulsão testadas.

Sigla	Composição da nanoemulsão	Amostra sonicada
A	5 ml do óleo de copaíba + 5ml de polissorbato 80+ 90ml de água destilada	Sim
B	5 ml do óleo de copaíba + 5ml de polissorbato 80+ 90ml de água destilada	Não

Este teste foi realizado no Laboratório de Compostos Híbridos Interfaces e Colloides, do Departamento de Química Fundamental, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS SINTETIZADAS

3.6.1 Análise Macroscópica

As membranas produzidas foram submetidas às análises visuais e táteis para avaliar: cor, continuidade (ausência de rupturas e fraturas após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou visíveis a olho nu, ou zonas de opacidade ou de cores diferenciadas) e manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura).

As alterações macroscópicas foram mostradas por meio de uma tabela para comparação entre as membranas de quitosana emulsão e nanoemulsão de copaíba. Esta análise foi classificada em alta, intermediária e baixa.

As membranas foram sintetizadas no laboratório de Caracterização de Materiais da UFPA, campus Ananindeua-Pará.

3.6.2 Análise Morfológica

A análise morfológica foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um equipamento analítico de microscópio da marca Tescan-Vega 3 (Kohutovice, República Tcheca), equipado com fonte de elétrons de emissão de campo de 5 kV. Antes da observação, as amostras foram cortadas com

nitrogênio líquido, montadas em um esfregão de metal e revestidas com uma fina camada de ouro-paládio.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Programa de Pós- Graduação de Física da Universidade Federal do Pará (PPGF/UFGPA).

3.6.3 Análise de Difractometria de Raios X (DRX)

As análises por DRX foram realizadas no Difrátômetro de raios X (DXR) modelo Empyrean da PANalytical (Malvern, Reino Unido), usando tubos de raios X cerâmico de anodo de Co ($K\alpha_1 = 1,789010 \text{ \AA}$), foco fino longo, filtro $K\beta$ de Fe, detector PINCEL3D-Medpix 3 1x1, no modo scanning, com voltagem de 40kV, corrente de 35mA, tamanho do passo $0,0263^\circ$ em 2θ , varredura de $3,00^\circ$ a $95,00^\circ$ em 2θ , tempo/passou de 59,92s, fenda divergente: $1/8^\circ$ e anti-espalhamento: $1/4^\circ$, máscara: 10mm.

A identificação de fases foi realizada por meio do software X-Pert HighScore Plus (Panalytical), versão 5.1.

Os ensaios de DRX foram realizados no Laboratório de Caracterização Mineral-LCM, no Instituto de Geociências, da Universidade Federal do Pará.

3.6.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As membranas foram analisadas por FTIR e, como pré-tratamento, as amostras foram secas a 60° C por 24 horas. Os espectros no infravermelho das amostras requeridas foram obtidas por reflectância total atenuada (ATR), utilizando-se um espectrômetro da marca Thermo, modelo Nicolet iS50 FT-IR, na região espectral de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$, a 100 scans e resolução de 4 cm^{-1} . A aquisição dos dados foi realizada através do software OMNIC.

Este teste foi realizado no Laboratório de Caracterização Mineral-LCM, no Instituto de Geociências, da Universidade Federal do Pará.

3.6.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As amostras das membranas foram submetidas à análise de calorimetria exploratória diferencial para avaliar a estabilidade das membranas frente às variações de temperatura, medindo o fluxo de calor entre a amostra e o material termicamente inerte quando submetidos a uma variação de temperatura, sendo possível identificar e analisar as modificações ocorridas no estado físico da amostra.

O equipamento utilizado foi um analisador termogravimétrico, modelo DSC- 60 da marca Shimadzu (Kyoto, Japão). Cerca de 5 mg de cada amostra foi colocada em um recipiente de alumínio fechado (cadinho), com dois furos na tampa. Inicialmente houve um aquecimento de 25°C à 250°C, em seguida isoterma de 250°C por 5 minutos, resfriamento de 250°C a 25°C, isoterma de 25°C por 5 minutos e aquecimento de 25°C à 550°C, com todas as variações de temperatura a uma taxa de 10° C/min sob fluxo de nitrogênio e 50mL/min, usando um cadinho de alumínio.

Este teste foi realizado no Laboratório de óleos da Amazônia, no Parque de Ciência e Tecnologia, na Universidade Federal do Pará, Campus Guamá.

3.6.6 Capacidade de absorção/percentual de intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado em triplicata, onde as amostras foram cortadas em formato de disco com 1 cm de diâmetro. Cada amostra foram inicialmente pesadas (amostra seca) e posteriormente imersas em Solução Tampão Fosfato-Salino (pH=7,2) e em água destilada, em temperatura ambiente, para avaliação do comportamento inicial de intumescimento das amostras em 24hs de análise.

As amostras foram pesadas em balança analítica digital (Marca Chyo, modelo JK 200) e logo em seguida imersas nos fluidos. Depois de cada tempo analisado, as membranas intumescidas foram removidas do meio e retirado o excesso de líquido da superfície por meio de papel filtro, submetidas a pesagem e imersas nas soluções (água e PBS) até o período de tempo proposto.

O percentual de intumescimento foi determinado por meio da diferença das amostras intumescidas em relação às amostras secas, calculada pela média das três repetições, de acordo com a Equação (1).

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{\text{MI (g)} - \text{MS (g)}}{\text{MS(g)}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: MI: massa da amostra intumescida; MS: massa da amostra seca

Este teste foi realizado no Laboratório do óleos da Amazônia, no Parque de Ciência e Tecnologia, na Universidade Federal do Pará, Campus Guamá e no Laboratório de Caracterização de Materiais da UFPA, campus Ananindeua-Pará.

3.6.7 Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato

A determinação do ângulo de contato das membranas sintetizadas foi realizada pelo método da gota séssil. Foi aplicada uma gota de água destilada (0,05 mL) sobre as superfícies das amostras das membranas com o auxílio de uma seringa. As amostras foram fixadas em uma lâmina de vidro por meio de fita adesiva dupla face, posicionada em frente de uma câmera de um smartphone e a imagem da gota capturada. As imagens capturadas foram transferidas para o *software ImageJ*, versão 1.51 n (National Institute Health, EUA) para mensuração do ângulo formado entre o contato da membrana e a gota de água.

Esta técnica foi realizada em triplicata, à temperatura ambiente e determinada pela média dos ângulos direito da gota no tempo de 30 segundos após a aplicação da gota. Os valores do ângulo de contato representam a média dos ângulos das três repetições.

Este teste foi realizado no Laboratório de óleos da Amazônia, no Parque de Ciência e Tecnologia, na Universidade Federal do Pará, Campus Guamá.

3.6.8 Determinação de Umidade

O percentual de umidade das membranas foi determinado pelo método gravimétrico, através da pesagem da massa inicial e da massa final das amostras de cada membrana, após 24 horas em estufa analógica (Sterilifer -modelo SX 1.2) com circulação forçada de ar a 105°C, após esse período foi obtida a massa final, de acordo com a Equação (2).

$$U (\%) = \frac{M_i(g) - M_f (g)}{M_i(g)} \times 100 \quad (2)$$

Onde: % U = percentual de umidade

M_i = massa da amostra inicial

M_f = massa da amostra final

O percentual de umidade das membranas foi realizado no Laboratório de óleos da Amazônia, no Parque de Ciência e Tecnologia, na Universidade Federal do Pará, Campus Guamá e no de Caracterização de Materiais da UFPA, campus Ananindeua-Pará.

3.6.9 Análise estatística

Os valores dos testes de intumescimento, umidade e ângulo de contato foram expressos como desvio padrão médio e avaliados por meio da análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

A diferença significativa entre as amostras testadas foi verificada através do teste de Tukey e o valor de d.m.s. (diferença mínima significativa) foi encontrado através da Equação (3).

$$d.m.s. = q \cdot \sqrt{\frac{QMR}{n}} \quad (3)$$

Onde:

q = Amplitude total estudentizada (valor tabulado), ao qual é função do grau de liberdade (GLR) e amostras;

QMR = Quadrado médio do resíduo dentro do grupo;

n = Número de repetições de cada amostra dentro do grupo.

3.7 ENSAIO BIOLÓGICO

3.7.1 Teste de atividade antibacteriana

A técnica de difusão de ágar foi utilizada para avaliar a atividade antibacteriana das membranas sintetizadas frente à bactéria gram-positiva *S. aureus*. Foi utilizada a cepa padrão (American Type Collection Culture- ATCC) de *S. aureus* 43300.

Para a realização dessa análise, inicialmente foi transferido, assepticamente, a suspensão de bactérias, e colocado na placa de Petri contendo o meio de cultura ágar nutritivo, na ordem de 1×10^8 UFC/mL, de acordo com a escala de turvação de 0,5 de McFarland. Todos os discos de papel de filtro estéreis de 6 mm foram impregnados com 10uL das amostras sintetizadas para testes e colocadas sobre a superfície do ágar Muller-Hinton inoculado. As placas foram incubadas durante 24-48 horas a uma temperatura de 37 ° C .

Após esse período foi verificado se houve inibição do crescimento bacteriano em torno dos discos de papel e medido os seus halos. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média da zona de inibição (mm) e desvio padrão.

Este teste foi realizado no Laboratório de Células Tronco da Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará, Campus Guamá.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA

Os componentes químicos voláteis do óleo de copaíba do estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Composição química do óleo de copaíba- em destaque (*) os componentes majoritários.

Componentes	Teor (%)
δ -Elemeno	0,5
α -Cubebeno	0,7
α -Copaeno	8,0
7-epi-Sesquitujeno	0,2
β -Elemeno	1,1
Sibireno	0,1
α -cis-Bergamoteno	0,2
*E-Cariofileno	35
*α-trans-Bergamoteno	19
β -Farneseno	0,4
α -Humuleno	5,0
Allo-Aromadendrene	0,6
g-Murolene	1,0
Germacreno D	3,2
β -trans-Bergamoteno	1,8
β -Selinene	2,0
α -Selinene	1,8
(Z)- α -Bisaboleno	1,2
(E-E)- α -Farneseno	0,1
*β-Bisaboleno	12,0
7-epi- α -Selilene	0,2
δ -Cadineno	3,0
E-- α -Bisaboleno	1,0
Germacreno B	0,2

Óxido cariofileno	0,2
Junenol	0,2
E- Sesquilandulol	0,1
2-epi- β -Cedren-3-ona	0,1
α -Cadinol	0,2

Foram identificados 29 compostos voláteis no óleo de copaíba, como mostrado na Tabela 3. Verificou-se que o principal componente do óleo de copaíba é o E-cariofileno (35%), seguido do α -trans-Bergamoteno (19%) e β -Bisaboleno (12 %).

Os demais compostos são encontrados em percentuais menores, porém importantes para comparação com outras pesquisas. Por exemplo, no estudo de RODRIGUES *et al.* (2019), o alfa-copaeno foi o principal constituinte sesquiterpeno encontrado, revelando importante atividade antileishmania *In vitro*. Diferentemente desse estudo, o α -Copaeno, é o quarto constituinte presente no óleo de copaíba com 8,0 % de concentração.

Entretanto, percebeu-se através do estudo em questão que os componentes do óleo de copaíba estão de acordo com os dados encontrados na literatura, onde o cariofileno é reconhecido como o principal marcador químico identificado em maior concentração em óleos de copaíba (LIMA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013 ; LIMA *et al.*, 2020; FROTA ; 2021).

Segundo ARRUDA *et al.* (2019) a composição química do óleo de copaíba é bastante variável entre os gêneros e indivíduos da mesma espécie, influenciada por fatores ambientais e pelo período da colheita. Além disso, os autores ainda afirmam que as adulterações são comuns, e afetam a composição química, e conseqüentemente, a qualidade do óleo.

O óleo de copaíba é composto de uma quantidade elevada de sesquiterpenos, contribuindo para cerca de 90% ou mais dos constituintes do óleo (LEANDRO *et al.*, 2012). Essa classe de substâncias é que garante as mais diversas propriedades farmacológicas atribuídas ao óleo de copaíba (SANTOS, 2008).

Existem alguns estudos que correlacionam as atividades antiinflamatórias com óleos que apresentam maiores teores de sesquiterpênicos em sua composição (PASCOAL *et al.*, 2020;LIMA *et al.*, 2021; AMES- SIBIN *et al.*, 2018; BECKER *et al.*, 2020). Todavia, alguns estudos (FERNANDES; FREITAS, 2007; SANTOS *et al.*, 2012) atribuem as propriedades biológicas à composição complexa do óleo de copaíba,

constituída pela mistura de sesquiterpeno e diterpeno que podem aumentar o efeito dos componentes ativos do óleo (LEANDRO *et al.*, 2012; MORELLI *et al.*, 2015)

A oleorresina também é composta por uma fase sólida ou resinosa com uma porção não volátil, constituída de vários ácidos diterpênicos biologicamente ativos, incluindo ácido copálico, ácido caurenóico, ácido alepteróico e ácido polialítico (ARRUDA *et al.*, 2019; TRINDADE, SILVA; SETZER, 2018). No entanto, no estudo, não foram analisados os constituintes diterpênicos do óleo de copaíba.

TEIXEIRA *et al.* (2017) associaram o efeito anti- inflamatório na reparação tecidual ao elevado teor de β -cariofileno presente no óleo de copaíba. Estudos *in vitro* realizados por VEIGA *et al.* (2007) evidenciaram efeito anti-inflamatório mais potente na espécie com maior concentração de β -cariofileno. AMES-SIBIN *et al.* (2018) evidenciaram melhora clínica da artrite em ratos quando tratados com β -cariofileno.

Em relação ao efeito cicatrizante, alguns estudos mostraram o potencial do óleo de copaíba em reduzir o tamanho da lesão (MARTINI *et al.*, 2016; PAIVA *et al.*, 2002; CAVALCANTI NETO *et al.*, 2005). Apesar dos benefícios do óleo na cicatrização, estudos têm sido realizados para entender esses efeitos, dada a composição química, que é diferente entre as espécies, e está correlacionada com a atividade biológica (ARRUDA *et al.*, 2019).

No estudo de SANTOS (2008) a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba foi efetiva contra espécies gram-positivas (*S.aureus*, *S.aureus* resistente à metilina, *S.epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*). Dessa forma, os princípios ativos presentes no óleo de copaíba podem oferecer proteção da ferida contra bactérias patogênicas.

RODRIGUES *et al.* (2018) estudando nanoemulsões do óleo, verificaram melhor efeito dos componentes bioativos do óleo de copaíba, potencializando as propriedades tanto físico-químicas como as biológicas.

Para LUCCA *et al.* (2015), a produção de nanoemulsões do óleo de copaíba ajudou na maior capacidade de penetração do cariofileno nas camadas mais profundas da pele, evidenciando uma melhor absorção do fitoquímico no tecido epitelial.

Em infecções microbianas, as nanoemulsões de fitocompostos surgem como alternativa promissora no combate a patógenos. No estudo de ALENCAR *et al.* (2015), constatou-se que as formulações nanoestruturadas do óleo de copaíba aumentaram consideravelmente a atividade antimicrobiana.

Pode-se, então, supor que o material sintetizado, por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba é favorável para tratar feridas cutâneas, muito embora esteja diretamente relacionado com sua composição química e preservação de seus constituintes bioativos na confecção do biomaterial.

4.2 TESTE DE ESPALHAMENTO DE LUZ (DLS) DAS MEMBRANAS POR NANOEMULSÃO DO ÓLEO

A emulsão do óleo de copaíba submetida ao método de emulsificação ultrassônica foi acondicionada em tubos de ensaio com tampa rosqueada e analisada no período de 7, 14 e 21 dias, em temperatura ambiente (25°C) e mantidas em repouso. A emulsão ultrassônica apresentou estabilidade, pois não foi observada macroscopicamente separação de fases, ou sugestão de aumento de viscosidade ou sedimentação.

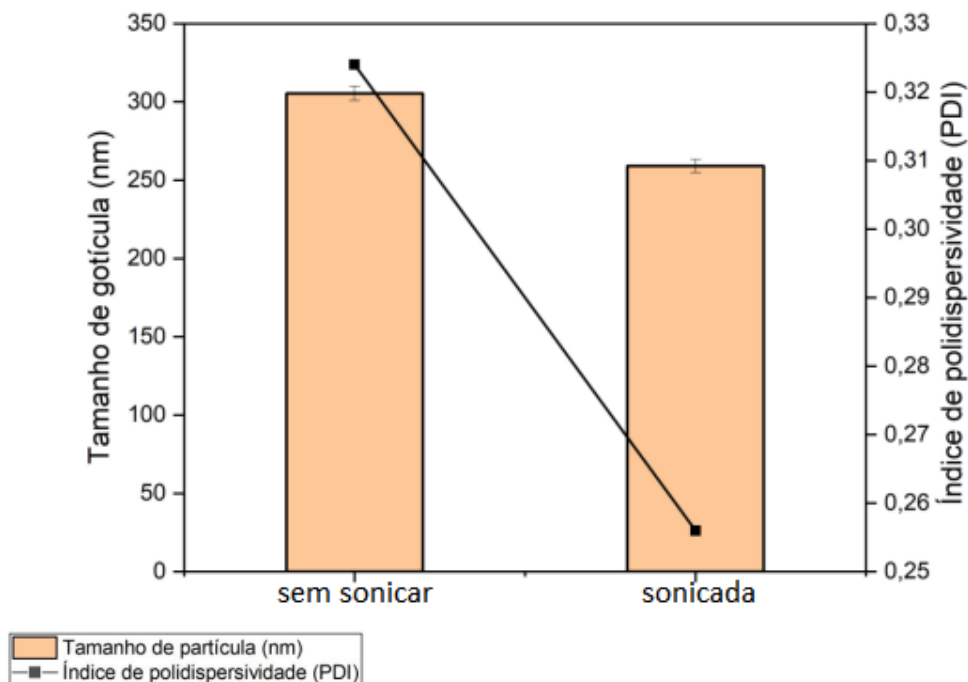
Na Tabela 2, é mostrado os valores do tamanho médio das gotas e o índice de polidispersividade (PDI) das emulsões ultrassonicadas e sem ultrasonicar

Tabela 2- Tamanho médio da gota e polidispersividade das emulsões do óleo de copaíba sonicada e sem sonicar.

Amostras	Tamanho médio das gotículas (nm)	Índice de Polidispersividade (PDI)
Emulsão sem sonicar	305 ±4,56	0,3 ±0,005
Emulsão sonicada	259 ±4,14	0,2 ±0,005

A Figura 11 mostra a relação do tamanho médio das gotículas das emulsões contendo óleo de copaíba/surfactante e o índice de polidispersividade (PDI) das formulações do óleo de copaíba sonicada e sem sonicar.

Figura 11- Tamanho médio da gota e polidispersividade das formulações do óleo de copaíba sonicada e sem sonicar.



Mediante os resultados obtidos, observou-se que a emulsão do óleo de copaíba submetida a ultrassonicação, apresentou valor de tamanho médio das gotículas ($259 \pm 4,14$ nm) mais baixo quando comparada com a emulsão do óleo não sonicada ($305 \pm 4,56$ nm).

Os dados demonstraram também baixo índice de polidispersividade (PDI) da emulsão do óleo sonicada, com PDI igual a $0,2 \pm 0,005$ nm, em comparação com a emulsão não sonicada ($0,3 \pm 0,005$ nm).

A sonicação da emulsão do óleo proporcionou a formação de gotículas pequenas do óleo. A esse respeito, JAISWAL, DUDHE E SHARMA (2015), consideram que o sistema ultrassônico das emulsões são eficazes para redução de gotículas. Segundo esses autores, a emulsão no tamanho nano atinge uma faixa de 10 a 1000 nm.

Logo, a sonicação da emulsão do óleo de copaíba foi satisfatória, uma vez que alcançou o tamanho das gotículas na faixa nanométrica. Pode-se inferir que a preparação da emulsão por ultrassom foi importante para reduzir o tamanho das gotículas do óleo, ao comparar com a emulsão do óleo não sonicada.

Segundo SUGUMAR *et al.* (2014), o PDI, com valores abaixo ou igual a 0,2, indica distribuição mais homogênea do tamanho das gotículas no sistema, logo, mais estável a nanoemulsão a longo prazo. Todavia, na medida em que o PDI aumenta, no

valor de 0,3 em diante, as gotículas se dispersam de maneira mais heterogênea e pode levar a instabilidade da nanoemulsão (DIAS *et al.*, 2014).

Para RODRIGUES *et al.* (2018), a emulsificação ultrassônica foi muito eficiente na redução do tamanho de gotículas das formulações à base do óleo bruto de copaíba e frações ricas em diterpeno, caureno e sesquiterpeno alfa copaeno, com diâmetro médio na faixa de 24,5 -200 nm, e baixa polidispersividade (PDI), caracterizando-as como nanoemulsões. Além disso, essas formulações foram capazes de potencializar significativamente o efeito anti-leishmania em estudos *in vitro*.

Nanoformulações do óleos vegetais podem ser consideradas uma abordagem eficaz no controle de larvas do *Aedes aegypti*. RODRIGUES *et al.* (2014), utilizando óleo de copaíba, surfactante e água obtiveram formulações que apresentaram tamanho médio de gota de $145,2 \pm 0,9$ nm e polidispersividade de $0,378 \pm 0,009$ após um dia de manipulação, e estas podem ser usadas como potencial larvicida.

As nanoemulsões são consideradas mais vantajosas, devido à melhor dispersão das gotículas do óleo, em nanômetros, na superfície, e, portanto, possibilitando melhorias nas propriedades nos filmes (PIRES; MOURA, 2017).

Para NORCINO *et al.* (2020) a emulsificação do óleo de copaíba foi benéfica para filmes à base de pectina, visto que o PDI atingiu valores abaixo de 0,6, indicando uniformidade do tamanho das gotas nas formulações. Concluíram ainda, que a nanoemulsão proporcionou funcionalidade ativas, preservou ou melhorou propriedades físico-químicas e antimicrobianas.

Nanocápsulas do óleo de copaíba revestidas de quitosana foram formuladas com êxito para melhorar a biodisponibilidade do paclitaxel, fármaco oral contra o câncer, com possível efeito anticancerígeno sinérgico com os componentes ativos do óleo de copaíba (XAVIER JÚNIOR *et al.*, 2019).

De acordo com RODRIGUES *et al.* (2014) o desenvolvimento de nanoemulsões de oleorresina de copaíba ajudou a manter a estabilidade dos constituintes presentes em sua composição, principalmente os sesquiterpenos, reduzindo possíveis efeitos de degradação. Conforme PIRES e MOURA (2017), o menor tamanho das partículas presentes em filmes, proporciona excelente característica para uma futura aplicação como curativos, devido à aplicação do óleo na forma de nanoemulsão.






Com isso, percebem-se as vantagens na utilização de nanoemulsões do óleo de copaíba na síntese de membranas no presente estudo, tanto por dispor de menores tamanhos das gotículas, quanto maior homogeneidade do óleo no material.

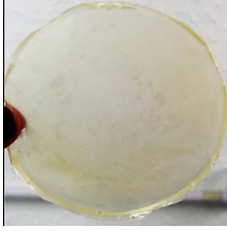



4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

4.3.1 Análise macroscópica das membranas

As características visuais e táteis das membranas sintetizadas por emulsão e nanoemulsão estão descritas no Quadro 6.

Quadro 6- Características macroscópicas das membranas.

Imagem	Sigla	Cor	Homogeneidade	Continuidade	Manuseabilidade
	MQ	Levemente amarelado +	Alta	Alta	Alta
	MQCo-0,1	Levemente amarelado +	Intermediária	Alta	Alta
	MQCo-0,5	Levemente amarelado +	Intermediária	Alta	Alta
	MQCo-1,0	Amarelo mais intenso ++	Baixa	Alta	Alta
	MQCo-5,0	Amarelo mais intenso ++	Baixa	Baixa	Baixa

	MQCoN- 0,1	Levemente amarelado	Alta	Alta	Alta
	MQCoN- 0,5	Levemente amarelado	Alta	Alta	Alta
	MQCoN- 1,0	Levemente amarelado	Alta	Alta	Alta
	MQCoN- 5,0	Levemente amarelado	Baixa	Baixa	Baixa

Observou-se que a membrana de quitosana sem óleo (MQ) exibiu uma cor ligeiramente amarelada, relativa transparência e homogênea. Quanto ao aspecto tátil mostrou-se de fácil manuseio, sem rompimentos (contínua) e pouco maleável.

Ao incorporar a emulsão do óleo de copaíba, foi observada visualmente uma diferença na coloração das membranas, principalmente àquelas sintetizadas com a maior quantidade do óleo. Essa observação foi notada nas emulsões com 1,0% e 5,0% (v/v) do óleo, as quais apresentaram a cor amarelada mais pronunciada e aparência menos homogênea. Na análise tátil, mostraram-se contínuas, bom manuseio e pouca maleabilidade. No entanto, a membrana com 5%(v/v) de emulsão do óleo apresentou-se quebradiça ao toque, descontínua e com óleo disperso na superfície, evidenciando que houve dificuldade do óleo de misturar-se completamente no sistema.

Diferentemente, as membranas produzidas a partir da nanoemulsão do óleo mostraram-se de coloração ligeiramente amareladas, aparentemente mais homogêneas, contínuas, de fácil manuseabilidade e pouco maleáveis. No entanto, a membrana

composta por 5,0 % (v/v) do óleo por nanoemulsão apresentou conteúdo oleoso na superfície, o que pode ter influenciado no aspecto quebradiço da composição.

Ao comparar, as sínteses e composições, parece que a síntese por nanoemulsão do óleo favoreceu a mistura dos componentes oleosos na solução de quitosana, observada pela diferença na cor das composições por nanoemulsão do óleo quando comparada com àquelas produzidas por emulsão do óleo. Todas, por nanoemulsão, foi possível notar redução da cor amarelada entre as composições.

Isso pode ter ocorrido devido o método de síntese utilizado, o qual induziu a formação do tamanho das gotículas do óleo em nanômetros e uma distribuição mais uniforme das gotas no polímero melhorando à interação do óleo vegetal na rede polimérica da quitosana. Todavia, a síntese por nanoemulsão do óleo não foi eficaz para favorecer a miscibilidade da membrana contendo 5,0% (v/v) do óleo, pois ainda foi notada visualmente separação de fases após processo de secagem.

Em relação a coloração das membranas, pode-se sugerir que a cor natural do óleo vegetal pode ter contribuído na intensidade amarelada das membranas obtidas por emulsão, associada também com a cor típica da quitosana e diretamente proporcional à concentração do óleo de copaíba e do polímero. Mas, evidenciou-se que a coloração diminuiu de intensidade na síntese por nanoemulsão do óleo.

À esse respeito, DEBONE *et al.* (2018), desenvolveram filmes de quitosana e óleo de copaíba, e obtiveram material com modificação na intensidade da cor amarela, sendo essa cor mais pronunciada em filmes com maior teor do óleo associada com o percentual elevado de quitosana. Os autores não observaram macroscopicamente separação de fases após secagem, demonstrando que houve possivelmente uma boa miscibilidade entre os componentes do óleo e do polímero, sendo favorecida principalmente quando aumentou a concentração da quitosana na solução.

Paralelo a esse estudo, GENESI (2015), evidenciou que a quitosana possui efeitos significativos na diferença de coloração de filmes contendo óleo de copaíba e gelatina, que pode ser atribuída pelo aumento da concentração do polímero no óleo, evidenciando possivelmente maior homogeneidade oleosa quando associado à níveis elevados de quitosana. Seus resultados mostraram ainda que a cor do filme foi diferente quando utilizou surfactante no óleo, deixando-o mais flexível e menos amarelado.

Por isso, acredita-se que a concentração de 5% (v/v) por emulsão e nanoemulsão do óleo na solução de quitosana, do presente estudo, apresentou pouca solubilidade, provavelmente relacionada com a pouca quantidade do polímero no óleo, e

consequentemente as gotículas oleosas não ficaram bem estabilizadas na solução de quitosana, resultando em material menos apropriado para confecção.

A solubilidade de compostos hidrofóbicos em matriz hidrofílicas foram estudadas por KIMURA *et al.* (2016), que obtiveram filmes de quitosana e óleo de andiroba. Esses autores não observaram separação de fase macroscópica nos filmes de quitosana com 1% e 2% associado com diferentes quantidades do óleo de andiroba (0,1%, 0,5% e 1%), indicando que as gotas do óleo foram estabilizadas na suspensão de quitosana.

Relatos similares ocorreram nos estudos de ALTIOK, ALTIOK e TIHMINLIOGLU (2010) ao incorporar o óleo de tomilho à quitosana. Seus resultados revelaram boa dispersão do óleo na formação do filme na matriz polimérica.

Diante dessas informações, pode-se supor que as membranas sintetizadas do óleo de copaíba por nanoemulsão melhorou a miscibilidade do polímero com os componentes do óleo vegetal quando comparadas com as membranas sintetizadas por emulsão do óleo. Correlaciona-se ainda, que a síntese por nanoemulsão, parece contribuir para aumentar a dispersão do óleo de copaíba na quitosana, dado os melhores aspectos de homogeneidade e manuseabilidade das membranas sintetizadas.

No que diz respeito aos materiais para curativos, o aspecto transparente e flexível são importantes para ajudar tanto na visualização da condição da ferida quanto na aderência do curativo na pele. Contudo, tanto a emulsão como as nanoemulsões não foram capazes de melhorar a maleabilidade das membranas.

4.3.2 Análise microscópica das membranas

A micrografia da membrana de quitosana sem óleo (MQ), apresentada na Figura 12, foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

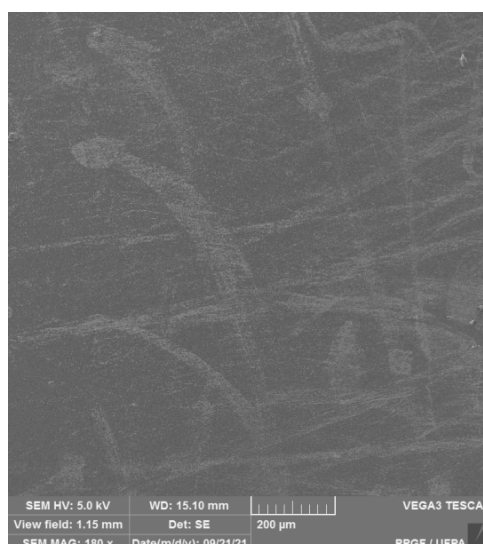


Figura 12 – Micrografia da membrana de quitosana sem óleo (MQ).

Pode ser observada uma superfície lisa e homogênea na amostra da membrana de quitosana sem óleo. Sobre isso, pode-se supor que houve uma boa solubilização da quitosana na solução de ácido acético, evidenciando a potencialidade da quitosana na formação de membrana contínua.

Na Figura 13, são mostradas as micrografias das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão do óleo de copaíba. A Figura 13a, corresponde à amostra contendo membrana de quitosana e 0,1% (v/v) do óleo por emulsão (MQCo-0,1). A amostra composta de quitosana e 0,5% (v/v) do óleo por emulsão (MQCo-0,5) está exibida na Figura 13.

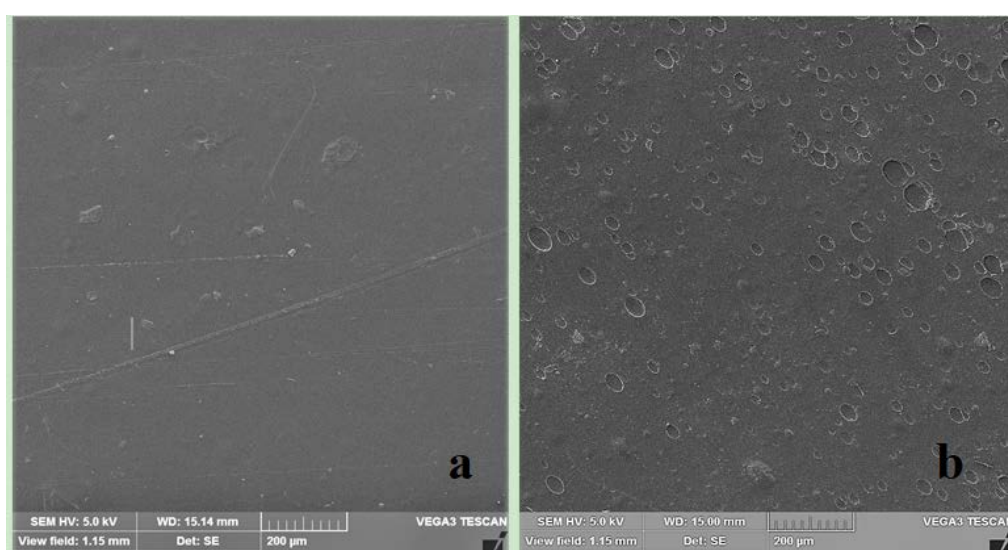


Figura 13 – Micrografia das membranas: (a) quitosana/copaíba 0,1% v/v (MQCo-0,1); (b) quitosana/copaíba 0,5 % v/v (MQCo-0,5).

A micrografia preparada com 0,1% (v/v) do óleo de copaíba por emulsão na quitosana demonstra superfície aparentemente lisa e surgimento de pequenas bolhas que pode estar relacionada com o encapsulamento do óleo no polímero, o qual não rompeu-se no processo de secagem. Já na micrografia da membrana de quitosana preparada com 0,5% (v/v) do óleo por emulsão foi possível observar uma superfície mais irregular com microestruturas arredondadas de tamanhos variados que pode estar relacionada a formação de porosidade com a inclusão do óleo na mistura.

Foram demonstradas na Figura 14, as micrografias das amostras compostas por 1,0 e 5,0% (v/v) do óleo por emulsão na quitosana. Na Figura 14a, é mostrada a micrografia da amostra contendo quitosana /1,0% (v/v) do óleo por emulsão. A micrografia da amostra com 5,0 % (v/v) do óleo por emulsão, foi apresentada na Figura 14b.

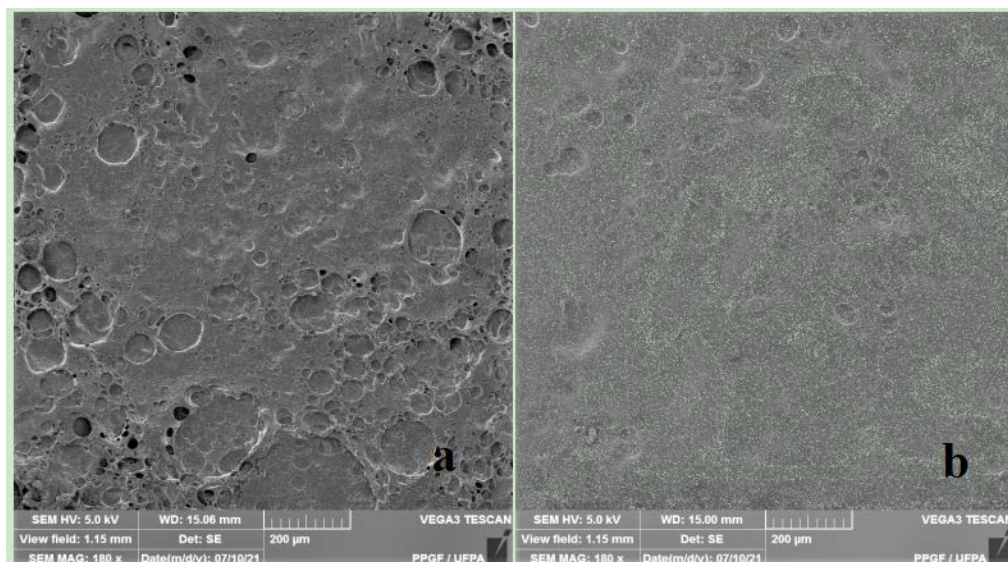


Figura 14 – Micrografia das membranas: (a) quitosana/copaíba 1 % v/v (MQCo-1,0); (b) quitosana/copaíba 5 % v/v (MQCo-5,0).

As micrografias das membranas compostas por quitosana e 1,0% (v/v) do óleo por emulsão apresentam superfície mais rugosa, com distribuição de poros na superfície. No entanto, a porosidade parece diminuir na amostra contendo quitosana e 5,0%(v/v) do óleo por emulsão, que pode ser atribuída a pouca solubilização do óleo na solução.

As micrografias de membranas de quitosana sintetizadas com óleo de copaíba por nanoemulsão foram apresentadas na Figura 15. Foi demonstrada na Figura 15a, a micrografia da amostra composta por 0,1 %(v/v) do óleo por nanoemulsão na quitosana. Na Figura 15b, é mostrada a micrografia da amostra contendo quitosana e 0,5% (v/v) do óleo por nanoemulsão.

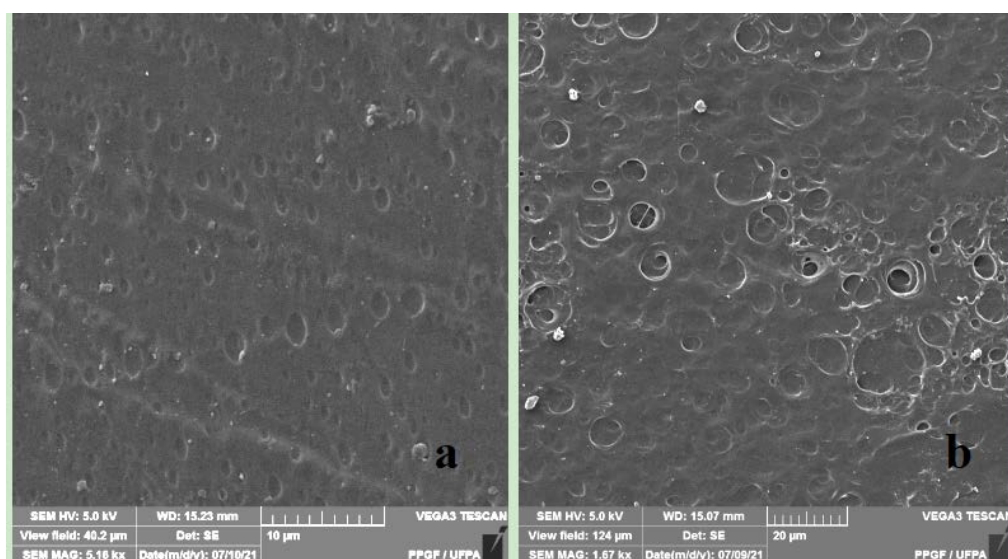


Figura 15 – Micrografia das membranas de quitosana com nanoemulsão do óleo de copaíba: (a) MQCoN-0,1; (b) MQCoN-0,5.

Quanto às micrografias das membranas de quitosana sintetizadas por nanoemulsão do óleo, à 0,1% (v/v) e 0,5%(v/v), supostamente ocorreu uma dispersão mais homogênea e numerosa dos poros na superfície das amostras.

Na Figura 16, são mostradas as micrografias das membranas de quitosana sintetizadas por nanoemulsão do óleo de copaíba. A Figura 16a, corresponde à amostra contendo membrana de quitosana e 1,0% do óleo por nanoemulsão (MQCoN-0,1). A amostra composta de quitosana e 5,0% (v/v) do óleo por nanoemulsão (MQCoN-0,5) está exibida na Figura 16b.

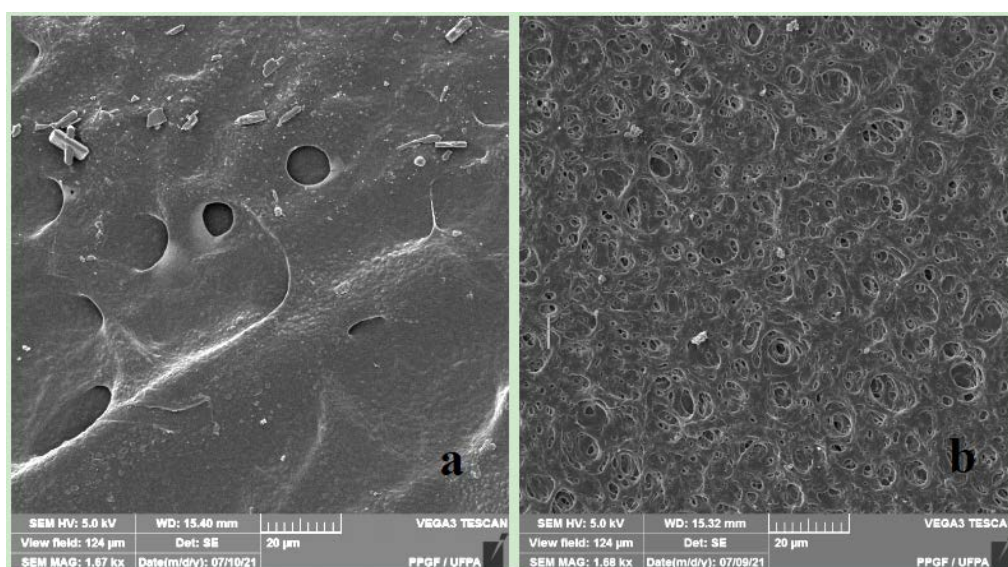


Figura 16 - Micrografia das membranas de quitosana com nanoemulsão do óleo de copaíba: (a) MQCoN-1,0; (b) MQCoN-5,0.

Verificou-se que a membrana de quitosana com 1,0 % (v/v) de nanoemulsão do óleo de copaíba demonstrou uma microestrutura irregular, mais densa, e porosidade menos numerosa. Entretanto, a porosidade tornou-se mais numerosa e interconectada na microestrutura da membrana de quitosana sintetizada por nanoemulsão do óleo de copaíba a 5,0 % (v/v).

Ao comparar as sínteses, observam-se microestruturas diferenciadas entre as composições e dependente da concentração oleosa. Pode ser observado que apenas as amostras por emulsão do óleo contendo 0,5% (v/v) e 1,0%(v/v) apresentaram superfícies mais irregulares e porosidades distribuídas de forma heterogênea na membrana de quitosana. Em todas, por nanoemulsão, foi possível notar superfícies irregulares e compostas de estruturas vesiculares compatíveis com porosidade dispersas

de modo mais homogênea na superfície da quitosana. Ao comparar com a síntese por emulsão do óleo, essas características microestruturais tiveram pouca influência do método utilizado e independente do teor oleoso.

Comparando as composições, observou-se que todas as membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo foram capazes de aumentar a quantidade de poros na superfície da quitosana, além disso proporcionou melhor distribuição da porosidade no polímero, relacionado ao processo de síntese que favoreceu a atuação do óleo na cadeia polimérica da quitosana. Isso pode ser favorável para ajudar na liberação controlada dos compostos bioativos do óleo na regeneração do tecido epitelial.

Esses resultados microestruturais, encontrados no estudo, pode justificar a aparência visual mais homogênea e mais clara da membrana de quitosana por nanoemulsão do óleo, as quais pode ter sido favorecida pela diminuição do tamanho das gotas, e possivelmente auxiliou na solubilização do óleo na quitosana facilitando a interação dos componentes usados nas confecções das membranas.

Segundo KENAWY *et al.* (2019), a estrutura rugosa nas superfícies das membranas aumentaram com adição de cinamaldeído, principal componente do óleo essencial de canela, na matriz de quitosana, podendo estar relacionada com a distorção interna das cadeia polimérica afetando a estrutura cristalina da quitosana. Acreditam que esse fenômeno ocorreu devido a influência de moléculas aromáticas heterogêneas entre as cadeias do polímero gerada pela reticulação de cinamaldeído com o grupamento amina livre ao longo da estrutura do polímero.

Tratando-se de porosidade, o estudo de REYES-CHAPARRO *et al.* (2015) obtiveram pequenos poros na superfície de filmes de quitosana contendo óleo essencial de cravo, indicando provavelmente que os componentes oleosos romperam a estrutura ordenada da quitosana, podendo inferir que o óleo foi incorporado na rede polimérica formando um novo composto.

Quanto ao tamanho de poros em membranas poliméricas com adição do óleo, SILVA *et al.* (2021), apontaram que à medida que aumentou-se a concentração do óleo de andiroba no filme polimérico a base de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) houve diminuição do número e tamanho dos poros. Esses autores, também, observaram que não houve retenção do óleo na superfície dos filmes, indicando uma boa interação do composto PCL/andiroba.

Quanto ao tamanho das gotículas do óleo de copaíba, DEBONE *et al.* (2018) notaram padrão descontínuo e heterogêneo das gotas nas superfícies das membranas de

quitosana com aumento do tamanho proporcional à concentração oleosa, que pode estar associado com a fase lipídica dispersa na matriz de quitosana, uma vez que o filme sem adição do óleo apresentaram microestrutura mais homogênea e sem descontinuidades.

Contudo, entende-se que a incorporação do óleo na rede polimérica e as características apresentadas pelo material é fator importante no processo de síntese de membranas, sendo crucial seu método de preparo.

A esse respeito, BONILLA *et al.* (2012), observaram que a microestrutura dos óleos em filme de quitosana são afetadas diretamente pelo processo de homogeneização, teor e tipo do óleo. Os resultados mostraram que a síntese por nanoemulsão dos óleos favoreceram na diminuição do tamanho das gotículas, portanto, uma melhor incorporação do óleo na rede polimérica.

KIMURA *et al.* (2016) obtiveram filme de quitosana e óleo de andiroba com microestrutura descontínua e heterogênea, associada à formação de duas fases (lipídeo e polímero), com surgimento de gotas de óleo à medida que aumenta a concentração oleosa, que pode indicar interação entre as composições do material produzido.

Resultado semelhante ocorreu estudo de ALTIOK, ALTIOK e TIHMINLIOGLU (2010), na adição do óleo de tomilho na formação de filmes de quitosana, evidenciando micrografia mais porosa e distribuição homogênea de poros relacionado diretamente com o aumento dos teores de óleo na estrutura de quitosana, mostrando provavelmente que o óleo influenciou na modificação do polímero.

Segundo GONZAGA (2018) e GRANDE TOVAR *et al.* (2020), a microestrutura apropriada dos poros é o fator importante no processo cicatricial, visto que a porosidade regula processos importantes para a regeneração tecidual, como a angiogênese, e permite o crescimento de tecido novo e sua integração ao tecido saudável em torno da lesão, prevenindo a ocorrência de infecções. Para esses autores, a interconectividade dos poros é uma propriedade importante para o transporte de nutrientes e de oxigênio para as células, portanto benéfica para a adesão e proliferação celular.

No presente estudo, não se utilizou método específico para estimar o grau de porosidade das membranas; contudo, foi possível identificar proporcionalidade entre os componentes da síntese e tamanho e quantidade de poros apresentados nas amostras estudadas, características importantes na produção de um biomaterial para uso em cicatrização epitelial.

Para tanto, os resultados podem indicar que a síntese por nanoemulsão do óleo influenciou fortemente na dispersão do óleo na superfície das membranas e

consequentemente na produção de poros. Por isso, quanto à porosidade, as membranas contendo MQCoN-0,5 e MQCoN-5,0 em suas composições, parecem ser mais apropriadas para favorecer a cicatrização de feridas. Contudo, tendo em vista à aparência visual e tátil inadequada da MQCoN-5,0, essa composição exige análise minuciosa para melhorar a mistura entre os componentes, pois foi interessante o resultado microestrutural entre as amostras analisadas.

Por isso, ressalta-se a importância da realização de outros testes de caracterização a fim de identificar características essenciais na síntese de biomateriais, visto que outros ensaios podem definir a melhor composição do material e o método adequado de síntese.

4.3.3 Difratoograma de raios X (DRX)

Os difratogramas do pó da quitosana e membranas de quitosana sem e com óleo de copaíba por emulsão sintetizadas, no presente estudo, estão apresentados na Figura 17.

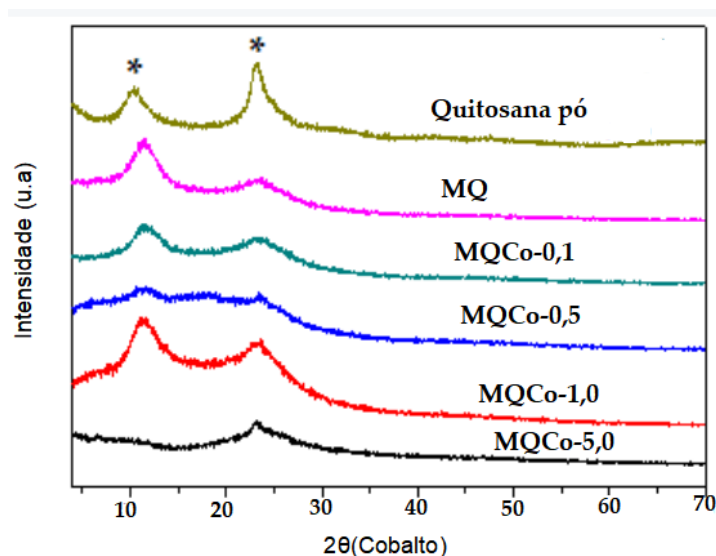


Figura 17- Difratoograma de raios X das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão do óleo de copaíba. O asterisco (*) significa picos característicos de quitosana.

No presente estudo, os picos de difração observados no difratograma das membranas por emulsão do óleo são típicos da quitosana. Nota-se padrão difratométrico com poucas reflexões de Bragg, com alargamento dos picos de difração em 2θ ($K\alpha Co$) iguais a $10,55^\circ$ e $23,37^\circ$, evidenciando a parte semi-cristalina do material, e com a inclusão do óleo foi observada a forma amorfa da composição quitosana e óleo.

Variação na intensidade e amplitude dos picos foram observados na membrana de quitosana sem óleo, assim como o deslocamento de ângulos em 2θ ($K\alpha Co$) iguais a $11,55^\circ$ e outro por volta de $23,70^\circ$, indicando também estrutura cristalina da composição da quitosana sem adição do óleo.

A incorporação do óleo por emulsão foi capaz de modificar o perfil de DRX da quitosana. Essas mudanças foram observadas por picos brandos nas composições MQCo-0,1 e MQCo-0,5. Por isso, pode-se inferir amorficidade nos picos das composições com quitosana/emulsão de 0,1 % (v/v) do óleo e quitosana/emulsão de 0,5 % (v/v) do óleo emulsionado, podendo estar associada com a inclusão da fase oleosa no polímero promovendo rompimento da organização da cadeia da quitosana.

Por sua vez, a composição contendo 1,0 % (v/v) por emulsão do óleo teve também influência para modificar a cristalinidade da quitosana, visto que os dois picos característicos da quitosana apresentaram intensidades moderadas e bases mais alargadas (2θ ($K\alpha Co$) iguais a $11,55^\circ$ e $22,96^\circ$), isso pode sugerir-se envolvimento favorável do óleo vegetal no polímero para a obtenção do composto.

A mudança na cristalinidade da quitosana manteve-se quando aumentou a concentração oleosa para 5,0% (v/v), evidenciada pelo pico mais amorfo dentre as amostras analisadas por emulsão, vista pelo desaparecimento do primeiro pico e segundo pico de baixíssima intensidade e amplitude em 2θ ($K\alpha Co$): $11,55^\circ$, característicos da quitosana.

De modo geral, observa-se que a emulsão do óleo de copaíba na síntese das membranas possivelmente modificou a cristalinidade da quitosana, devido deslocamento de ângulos, variações de intensidades de picos, picos mais alargados e desaparecimento de picos. Apesar disso, houve perfis de DRX diferentes entre as composições oleosas, que pode ser explicada pela microestrutura heterogênea das membranas estudadas, sugerindo boa interação dos materiais envolvidos na síntese.

O difratograma das membranas de quitosana sintetizadas por nanoemulsão, são apresentados na Figura 18.

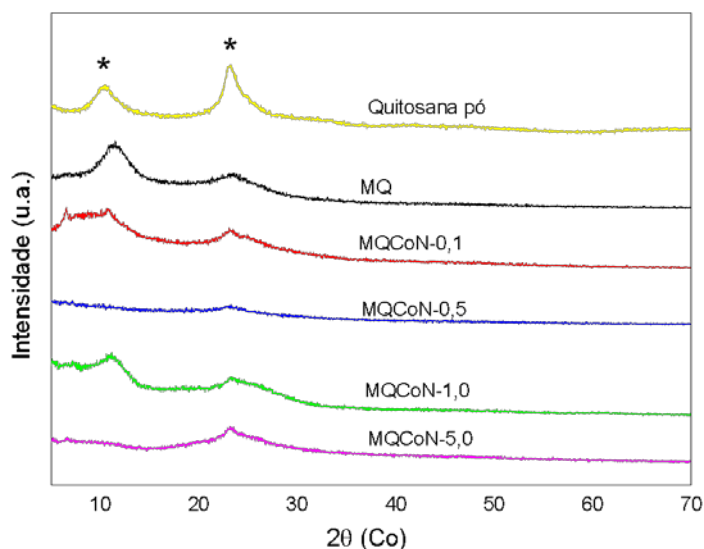


Figura 18- Difratoograma de raios X das membranas de quitosana sintetizadas por nanoemulsão óleo de copaíba. O asterisco (*) significa picos característicos de quitosana.

A incorporação do óleo por nanoemulsão, por sua vez, estreitou mais os picos de difração e induziu desaparecimento de picos, sugerindo alterações mais significativas na estrutura cristalina do polímero.

Tal como foi observado na composição oleosa de 0,1 % (v/v) por nanoemulsão do óleo que exibiu outro pico em 2θ ($K\alpha\text{Co}$)= $6,79^\circ$ e deslocamentos de picos em 2θ ($K\alpha\text{Co}$) iguais a $10,39^\circ$ e $23,99^\circ$, sugerindo permeabilidade favorecida do componente oleoso com o polímero.

Os picos de difração típicos da quitosana desapareceram completamente na composição por nanoemulsão do óleo à 0,5 % (v/v), caracterizando esse material como a estrutura mais amorfa, atribuída possivelmente pelo método de preparação utilizado que ajudou na miscibilidade entre os componentes da membrana. Esse comportamento pode ser explicado pela microestrutura mais porosa e melhor dispersa dos poros ao longo da superfície da quitosana dessa amostra em questão.

Pôde ser notado na composição 1,0%(v/v) do óleo por nanoemulsão a formação de outro pico em 2θ ($K\alpha\text{Co}$)= $3,76^\circ$ e pico deslocado em 2θ ($K\alpha\text{Co}$)= $24,69^\circ$ demonstrando diminuição da cristalinidade da quitosana, por sua vez, mostrando a capacidade de interação da fase oleosa com o polímero, podendo estar associada com a síntese.

A amorficidade foi notória à 5,0% (v/v) do óleo por nanoemulsão devido ausência dos picos de difração da quitosana. Esse resultado pode estar relacionado com a a

porosidade da superfície e a interconexão entre os poros da composição estudada, que pode ter induzido melhor interação oleosa com o polímero. Fica evidente que a microestrutura das superfícies das membranas estudadas conferiu comportamentos de compatibilidade diferenciados entre as composições.

No geral, observou-se maior amorficidade no difratograma das membranas com a adição das nanoemulsões do óleo, podendo sugerir maior miscibilidade entre os componentes das membranas, possivelmente auxiliado pelo menor tamanho de gotículas e melhor dispersão das gotas oleosas na superfície da quitosana produzidas no processo da síntese da nanoemulsão. Ainda assim, o perfil de DRX diferiu entre as composições por nanoemulsão do óleo, que pode ser também atribuída a heterogeneidade das superfícies das membranas que influenciou no comportamento diferente de interação entre os componentes usados na preparação das membranas por nanoemulsão.

Uma natureza semicristalina da quitosana foi evidenciada no estudo de BRAZ *et al.* (2018), com dois picos de difração largos, em 2θ iguais a 9° e 20° , característicos do polímero, coincidindo com os resultados encontrados ao estudo, em relação aos picos de difração da quitosana.

A quitosana possui características semi-cristalinas, que no difratograma, se apresentam sob a forma de picos amplos. Concordando com os resultados do presente estudo, GONZAGA (2018) aponta que nos difratogramas da quitosana pura e da membrana de quitosana, é possível observar dois picos alargados na região de $2\theta = 10,1^\circ$ e 20° , sendo que o primeiro pico corresponde a estrutura cristalina hidratada e o outro a estrutura amorfa da quitosana.

A presença de picos menos definidos nos difratogramas contendo emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba pode ser resultado da atuação do óleo nas cadeias poliméricas, tendo entrada favorecida na rede semi-cristalina da quitosana. Em um estudo semelhante realizado por RODRIGUES *et al.* (2020), comportamento similar foi observado na interação entre ciclodextrina e óleo de copaíba causando mudanças no perfil de DRX resultando na formação de complexos de inclusão.

Corroborando com o estudo em questão, NORCINO *et al.* (2020), notaram alterações nos picos de difração de filmes de pectina após a incorporação do óleo de copaíba, podendo ser atribuídas a inclusão dos compostos oleosos na estrutura da pectina que pode ter modificado o espaçamento interplanar e deformado a rede cristalina do polímero.

GRANDE TOVAR *et al.* (2020) observaram também que a estrutura cristalina da quitosana foi levemente afetada com a incorporação do óleo essencial de *Ruta graveolens* em baixa quantidade, mas em proporções maiores geraram melhores efeitos na perda da cristalinidade do polímero, relacionada provavelmente à novas interações da quitosana com alguns componentes do óleo essencial que romperam a estrutura cristalina original da quitosana.

Da mesma forma, VALENZUELA, ABUGOCH e TAPIA (2013) relataram que a introdução de óleo de girassol na matriz da proteína de quinoa e quitosana gerou uma estrutura menos cristalina, que pode estar associada as interações intermoleculares entre os componentes do filme que implicaram na alteração da rede cristalina.

Segundo SALAMA, AZIZ e SABAA (2019) as curvas de DRX da quitosana foi modificada com a adição de óleo essencial de olíbano, reduzindo a cristalinidade de filmes à base de carboximetilcelulose e cloridrato de quitosana biguanidina, vistas pela redução da intensidade e aumento da amplitude dos picos cristalinos.

De acordo com PIRES, BIERHALZ e MORAES (2015), o aumento da cristalinidade dos materiais propostos para potencialização da cicatrização de lesões epiteliais tende a reduzir sua bioatividade e taxa de reabsorção desses materiais.

Pode-se então inferir que as células do tecido epitelial possui maior compatibilidade com materiais amorfos, dada o melhor estímulo na formação de novos tecidos para ajudar na cicatrização de feridas.

Portanto, no presente estudo, baseado nos resultados difratométricos, entende-se que as membranas de quitosana contendo nanoemulsões do óleo de copaíba apresentam características benéficas e com maior potencial para uso como biomaterial.

4.3.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 19 compara os espectros na região do Infravermelho do pó de quitosana e da membrana de quitosana isenta do óleo (MQ). Observa-se que as bandas dos espectros são bastantes semelhantes, e os resultados se sobrepõem, uma vez que não foram observadas deslocamentos, variações de intensidades ou surgimento de novos picos.

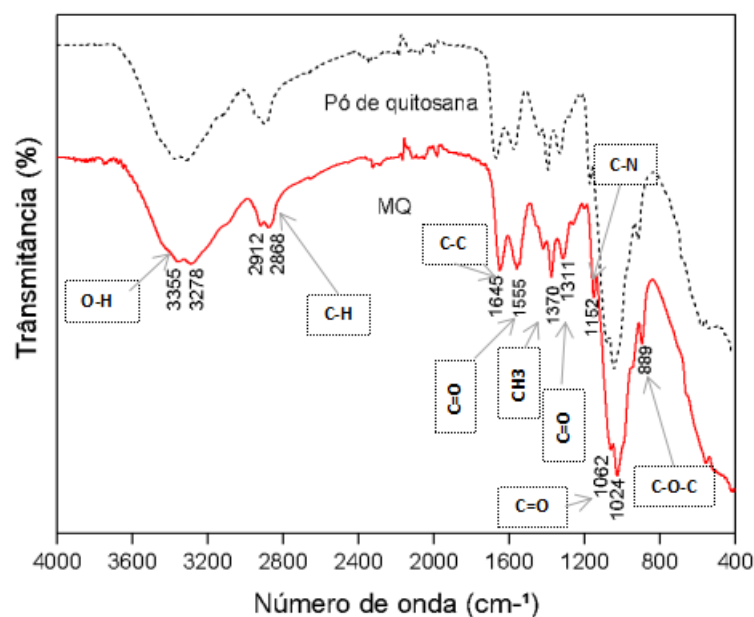


Figura 19- Comparação entre os espectros na região do Infravermelho do pó de quitosana e a membrana de quitosana sem óleo (MQ).

Segundo o resultado, constata-se que os sinais espectrais da quitosana em pó foram semelhantes com a membrana de quitosana sem óleo (MQ), visto que não houve surgimento de novas bandas e deslocamentos de picos.

Os dados evidenciam uma banda larga com estiramento do grupo O-H (3500 e 3200 cm^{-1}), estiramento em C-H (2950 - 2850 cm^{-1}) e ligações entre C-C e C=O do grupo amino acetilados da quitosana (1650 - 1550 cm^{-1}).

Outros grupamentos da quitosana foram encontrados, como por exemplo, o grupo C-H₃ (1370 cm^{-1}), o grupo C=O (1311 cm^{-1}) e uma ligação C-N (1152 cm^{-1}).

A presença das bandas, entre 1100 e 1000 cm^{-1} , associam-se às ligações do tipo C=O, assim como a banda 880 cm^{-1} é atribuída à ligação da estrutura de polissacarídeo.

Para tanto, as regiões de absorção características da quitosana, encontradas no estudo, possuem os sinais espectrais de materiais poliméricos (BRAZ *et al.*, 2018; CATANSAZO *et al.*, 2021; SOBREIRA *et al.*, 2020). Por isso, pode-se inferir que a síntese da quitosana na forma de membrana não modificou os grupos funcionais típicos desse polímero, evidenciados pela semelhança dos espectros entre o pó e a membrana.

Os espectros da membrana de quitosana sem óleo (MQ), sintetizada no estudo, foram relacionados com as bandas e grupos funcionais correspondentes ao polímero, conforme observadas em literatura (SOBREIRA *et al.*, 2020; BRAZ *et al.*, 2018; CATANZANO *et al.*, 2021), e, estão descritas no Quadro 7.

Quadro 7 - Relação entre bandas e grupos funcionais da membrana de quitosana (MQ).

Bandas (cm ⁻¹)	Grupos funcionais
3500-3200	O-H
2950-2850	CH
1650-1550	C=O-NH
1370	CH ₃
1311	CO
1152	CN
1100-831	C-O-C C-O

Fonte: SOBREIRA *et al.*, 2020; BRAZ *et al.*, 2018; CATANZANO *et al.* (2021)

Segundo SOBREIRA *et al.* (2020), o perfil de FTIR da quitosana pode sofrer alterações quando relacionado a outros compostos. Assim, variação de intensidade pode significar pequenas mudanças na estrutura química do polímero. Além disso, deslocamentos e novos picos podem também indicar interação entre componentes do material.

A Figura 20 compara os espectros na região do infravermelho das amostras de membranas de quitosana com óleo de copaíba sintetizadas por emulsão, nas diversas concentrações (MQCo-0,1; MQCo-0,5; MQCo-1,0 e MQCo-5,0), e o espectro da membrana de quitosana sem óleo (MQ).

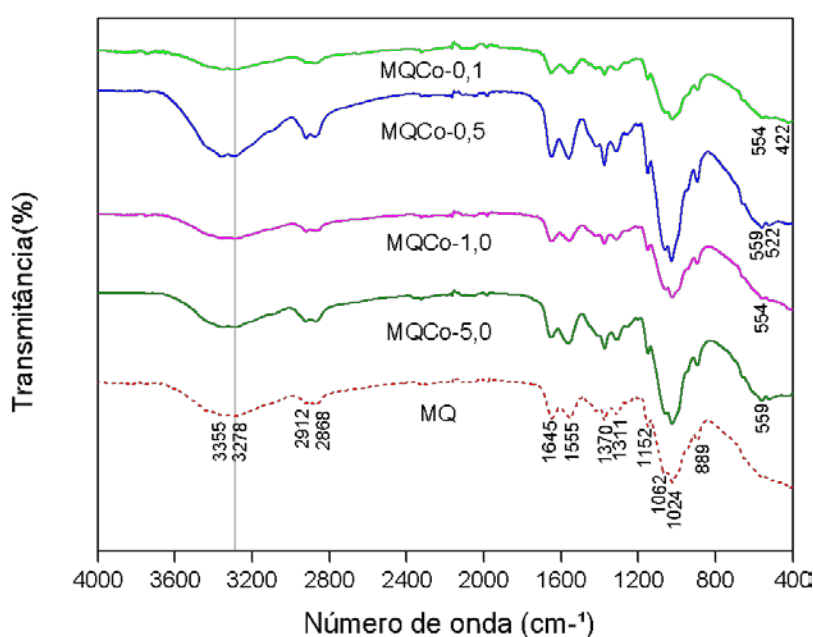


Figura 20 - Comparação entre os espectros na região do infravermelho das membranas de quitosana por emulsão do óleo e a membrana de quitosana sem óleo (MQ).

Nota-se que houve semelhança entre os espectros da membrana de quitosana sem e com óleo de copaíba por emulsão. No entanto, a incorporação do óleo possibilitou a intensificação ou amenização de bandas. Além disso, houve o surgimento de novas bandas, atribuídas possivelmente aos constituintes do óleo vegetal.

Banda larga na região $3400-3200\text{ cm}^{-1}$, o qual corresponde ao estiramento do grupamento O-H da molécula da quitosana, não desapareceu com a adição do óleo de copaíba. Observou-se diferenças de intensidades nos espectros contendo óleo por emulsão, como por exemplo, a membrana de quitosana com 0,1 % e 1,0% (v/v) do óleo apresentou intensidade diminuída, e a composição com 0,5 % (v/v) com aumento na intensidade do espectro.

Estudos mostram que o padrão espectrométrico da copaíba está centrado em 2920, 2853, 1735 e 1160 cm^{-1} , correlacionados ao alongamento dos grupamentos CH, O-CH₂, C=O e C=O, respectivamente (RIBEIRO *et al.*, 2020; NORCINO *et al.*, 2020; MAZUR, 2019). A banda em 1740 cm^{-1} , também típica do óleo, está relacionada com a ligação C=O e a banda média ampla entre 3110 e 2700 cm^{-1} é atribuída aos ácidos carboxílicos (MAZUR, 2019).

A respeito disso, NORCINO *et al.* (2020) apontam em seus estudos que os hidrocarbonetos alifáticos, como os sesquiterpenos e outros componentes do óleo foram identificados nas regiões entre 2921 e 2850 cm^{-1} , assim como a banda em 885 cm^{-1} , atribuída a presença do cariofileno, principal constituinte da copaíba.

No Quadro 8, são descritas as bandas e os grupamentos funcionais do óleo de copaíba relatadas na literatura (RIBEIRO *et al.*, NORCINO *et al.*, 2020; MAZUR , 2019).

Quadro 8 - Relação entre bandas e grupos funcionais do óleo de copaíba.

Bandas (cm^{-1})	Grupos funcionais
3110-2700	Ácidos carboxílicos
2921-2850	Hidrocarbonetos alifáticos
2920	CH
2853	O-CH ₂
1735-1740	C=O

1160	C=O
885	Cariofileno

Fonte: RIBEIRO *et al.*, NORCINO *et al.*, 2020; MAZUR, 2019

Observa-se espectros de diferentes intensidades e surgimento de novas bandas nas membranas de quitosana preparadas por emulsão do óleo.

As bandas emergentes possivelmente estão relacionadas com a interação da quitosana com o óleo vegetal, visto que tais espectros não são atribuíveis ao componente do polímero, indicando a formação de uma nova composição.

As novas bandas surgiram nos espectros entre 500-400 cm^{-1} , que pode estar relacionada aos constituintes do óleo de copaíba, já que estas estão ausentes nos espectros da membrana de quitosana sem óleo, sendo 554 cm^{-1} e 422 cm^{-1} em MQCo-0,1; 559 cm^{-1} e 522 cm^{-1} em MQCo-0,5; 554 cm^{-1} em MQCo-1,0; e, 559 cm^{-1} em MQCo-5,0.

Segundo as observações de LIMA *et al.* (2021), esses picos adicionais do óleo podem estar relacionados aos terpenóides presentes em sua composição e sua interação física com a quitosana.

Por isso, acredita-se que houve a interação entre os componentes do estudo em questão na formação da membrana por emulsão que pode ser favorável a para potencializar ou melhorar efeitos relacionados à propriedades dos materiais.

Quanto aos espectros na região do Infravermelho das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba, observam-se semelhanças e sobreposição de dados ao comparar com a membrana de quitosana sem óleo, como demonstrado na Figura 21.

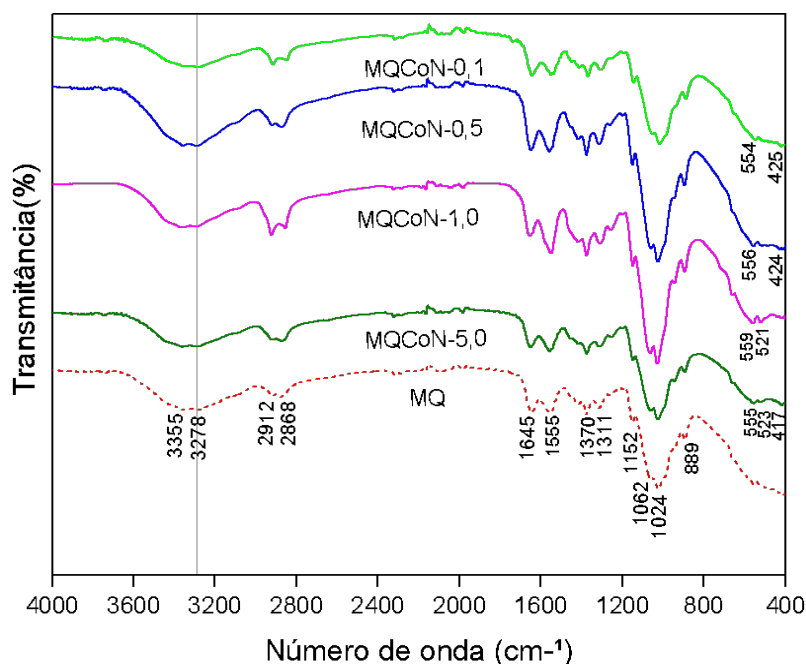


Figura 21 - Espectros na região do Infravermelho das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo e a membrana de quitosana sem óleo (MQ).

Pode-se constatar que também ocorreu surgimento de novos picos nos espectros da membrana de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba, entre 889 cm^{-1} a 417 cm^{-1} .

Esses picos podem estar relacionados à adição de constituintes do óleo e as variações de intensidades dos espectros sugere-se possível interação molecular entre os componentes dos materiais sintetizados.

Comparando os espectros entre as composições, observou-se que as membranas contendo $0,5\%$ (v/v) e $1,0\%$ (v/v) de nanoemulsão do óleo tiveram intensidades aumentadas em relação ao pico 1024 cm^{-1} . Tal fato pode estar associado às alterações do grupo CO da molécula de quitosana, provavelmente influenciadas pelos componentes do óleo.

Foi observado ainda novas bandas (556 cm^{-1} e 424 cm^{-1}) em MQCoN-0,5 e picos (559 cm^{-1} e 521 cm^{-1}) em MQCoN-1,0, sugerindo interação entre os constituintes do óleo com as moléculas de quitosana.

Por outro lado, os espectros das membranas de quitosana com $0,1\%$ (v/v) e $5,0\%$ (v/v) de nanoemulsão do óleo demonstraram-se bandas mais amenas (1024 cm^{-1}). Além disso, foi possível observar o surgimento de novas bandas nas composições MQCoN-0,1 (554 cm^{-1} e 425 cm^{-1}) e MQCoN-5,0 (555 cm^{-1} , 523 cm^{-1} e 417 cm^{-1}).

Resultados semelhantes foram observados no estudo de MAZUR (2019), com alteração nos espectros de FTIR após a incorporação de dietilditiocarbamato/nanopartícula de cera de abelha contendo óleo de copaíba, evidenciando interação entre os componentes.

RIBEIRO *et al.* (2020) relataram diferença nos perfis espectrométricos das nanoemulsões do óleo de copaíba/alginato/triptano em relação aos espectros observados das amostras isoladas, com imersão de uma nova banda em 3365 cm^{-1} , relacionados, possivelmente, com a boa interação entre os grupos hidroxilas presentes nos tensoativos e o biopolímero.

O aparecimento de um pico em 885 cm^{-1} no espectro de filmes de pectina e copaíba no estudo de NORCINO *et al.* (2020) foi atribuída a presença do componente cariofileno, assim como o aumento de intensidade das bandas 2921 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} foi relacionado aos sesquiterpenos, indicando interação intermolecular entre os compostos. Além disso, os autores encontraram uma diminuição nas bandas entre $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, correspondente a faixa de estiramento -OH que pode sugerir uma redução dos grupos hidroxilas da pectina com anidridos de ácidos graxos.

Segundo GRANDE TOVAR *et al.* (2020) os espectros de FTIR de filmes de quitosana mostraram a presença do óleo essencial de *Ruta graveolens* em todas as diferentes composições oleosas, relacionados com o aumento de intensidade de bandas, o que pode indicar interação dos grupos funcionais da quitosana com alguns componentes do óleo.

Foi possível observar no estudo de VALENZUELA, ABUGOCH e TAPIA (2013) melhor interação no espectro de FTIR de filmes de quinoa-quitosana em níveis mais elevados de óleo de girassol, observada pela única banda presente deste filme que correspondeu a deformação antisimétrica CH_3 do ácido oleico em óleo de girassol, além de bandas características de ligações éster das ligações de triglicerídeos e bandas relacionadas às insaturações conjugadas *cis* do ácido oleico.

De modo semelhante, o estudo de SALAMA, AZIZ e SABAA (2019) mostraram interações bem sucedidas da quitosana modificada com a adição de óleo essencial de olíbano, com perfis de FTIR evidenciando bandas mais intensas e amplas relacionadas com as ligações e grupamentos encontrados no componente oleoso, indicando boa compatibilidade entre os componentes do filme.

Levando em consideração o levantamento de dados obtidos pela literatura, a respeito da espectroscopia na região do infravermelho da quitosana e o óleo de copaíba,

o estudo em questão revelou que as bandas encontradas nos espectrogramas do biopolímero e do óleo correspondem às ligações e estiramentos característicos de suas composições químicas.

A partir destas informações, a comparação com a espectroscopia realizada para o biomaterial com dois componentes, demonstrou que a quitosana e o óleo de copaíba mantiveram alguns espectros semelhantes da quitosana sem óleo, mas diferenciando-se na variação de intensidade e amplitude, assim como no aparecimento de novas bandas, demonstrando possivelmente que houve interação química e conseqüentemente alterações moleculares.

No entanto, os efeitos mais evidentes de interação ocorreram nas nanoemulsões do óleo de copaíba, provavelmente relacionada com a microestrutura mais porosa e interconectada conferindo-lhes uma maior incorporação do óleo na rede polimérica da quitosana.

Portanto, sugere-se que as membranas de quitosana com adição de nanoemulsão do óleo de copaíba podem apresentar maior atividade cicatricial pela presença de maior quantidade de bandas características de compostos bioativos presentes na quitosana e no óleo.

4.3.5 Análise térmica- DSC

Os termogramas obtidos por DSC das membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo, são apresentados na Figura 22

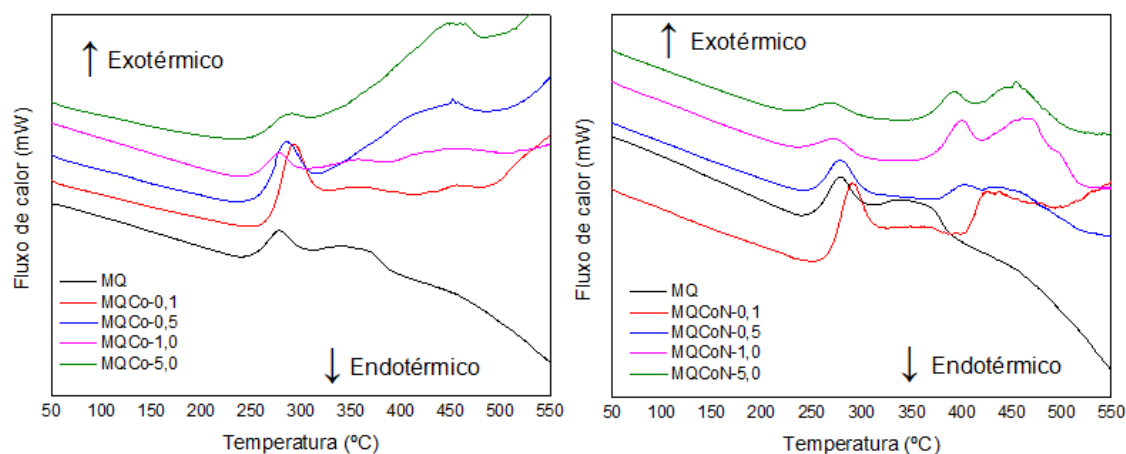


Figura 22- Análise DSC (segunda temperatura de aquecimento) das membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo.

O termograma de DSC do estudo em questão foi analisado a partir da segunda temperatura de aquecimento, uma vez que o primeiro aquecimento correspondente ao evento endotérmico está relacionado com a evaporação da água.

Por isso, notam-se as curvas de DSC, por emulsão e nanoemulsão do óleo, associadas aos eventos exotérmicos, caracterizando-as como a fase de degradação dos componentes dos materiais sintetizados.

Pode-se observar que a degradação da membrana de quitosana sem óleo (MQ) ocorreu aproximadamente à 278° C, referente à eliminação completa de seus constituintes químicos.

No entanto, à medida que adicionou óleo de copaíba, a temperatura de decomposição da quitosana modificou para valores um pouco mais elevado, podendo significar que a presença de constituintes do óleo combinado com a quitosana exigiu reforço térmico para total eliminação do material.

Todavia, as concentrações oleosas não influenciaram de maneira proporcional na elevação da temperatura de degradação do material. Tanto que a quantidade mínima do óleo teve o desvio de pico mais alto, à 292°C, para degradar-se, enquanto para as demais composições oleosas foram necessárias temperaturas mais baixas para que o material fosse eliminado.

Esse fato pode ser explicado pela cristalinidade dos materiais obtidos, tendo em vista que estruturas menos cristalinas são facilmente eliminadas termicamente devido maior grau de desordem na composição formada.

Ao comparar as composições por emulsão do óleo, constatou-se que as composições quitosana/0,5% (v/v) emulsão do óleo e quitosana/5,0% (v/v) obtiveram temperaturas de degradação relativamente baixa e aproximadas (287°C e 286°C). Aparentemente a composição de quitosana/1,0 de emulsão do óleo foi a amostra que apresentou a temperatura mais baixa para degradar-se.

Esses efeitos térmicos diferenciados podem estar associados com a menor cristalinidade dessas composições oleosas por emulsão, o qual favoreceu a degradação do material devido a um maior grau de desorganização na estrutura do composto que pode ter facilitado a decomposição térmica.

Em relação às membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo, pode-se notar que a degradação da quitosana atingiu graus mais elevados de temperatura quando comparado com o pico exotérmico das membranas por emulsão do óleo.

Observou-se nas curvas de DSC, por nanoemulsão do óleo, outros picos exotérmicos com temperaturas mais elevadas entre as composições oleosas. Dois picos exotérmicos foram encontrados no DSC da membrana de quitosana/0,1%(v/v) nanoemulsão do óleo (291°C e 423°C). Nas demais composições, dois a três picos exotérmicos também foram identificados, como por exemplo, na composição MQCoN-0,5 (278°C, 401°C), MQCoN-1,0 (273°C, 400°C, 464°C), MQCoN-5,0 (270°C, 393°C, 455°C).

Entende-se com esse resultado que as temperaturas iniciais e finais das composições por nanoemulsões do óleo foram mais altas para a decomposição completa de seus constituintes. Isso pode estar associado com a síntese usada para a confecção da membrana que ajudou na formação de microestruturas mais adequadas dos materiais, evidenciando boa interação vistas pela MEV, DRX e FTIR.

Ao comparar, método de síntese, parece que o método por nanoemulsão do óleo foi mais eficaz para melhorar a estabilidade da quitosana, devido comportamento térmico mais elevado para a decomposição final do óleo com a quitosana, o que pode sugerir que houve maior interação dos componentes oleosos no polímero, portanto, exigindo temperaturas mais elevadas para a eliminação total do composto.

Esses eventos exotérmicos, observados nos termogramas, estão relacionados à degradação, que correspondem à evaporação e à temperatura de fusão das membranas sintetizadas no presente estudo. Esses eventos podem significar mudanças físicas ou químicas nos materiais, relacionados à decomposição, vaporização e eliminação de produtos voláteis (GENESI, 2015).

Por isso, pode-se afirmar que os picos exotérmicos vistos na membrana de quitosana sem óleo do estudo em questão são tipicamente atribuídos à decomposição estrutural das unidades glucosaminas da cadeia polimérica da quitosana (LIMA *et al.*, 2021; MARTINS; MORGADO; ASSIS, 2016).

Sobre isso, BRAZ *et al.* (2020), concluíram em seus estudos, que os materiais derivados da quitosana, ao atingir valores mais elevados de temperatura, podem estar indicando uma maior estabilidade térmica dos materiais modificados.

Segundo DEBONE *et al.* (2018) a incorporação do óleo de copaíba foi capaz de reduzir a decomposição da quitosana à medida que aumentou a quantidade do óleo, visto pelo comportamento térmico mais elevado para a completa eliminação dos componentes do filme quitosana/óleo de copaíba, o que pode significar que o calor liberado para a degradação foi menor para filmes com maior teor de óleo.

À respeito disso, PASCOAL *et al.* (2020) apontaram que a degradação do óleo de copaíba atingiu eventos térmicos elevados, comumente atribuídos à evaporação dos constituintes voláteis do óleo, os quais representam a composição majoritária, principalmente o composto cariofileno. Isso pode explicar a estabilidade da quitosana com a adição do óleo na preparação da membrana no referido estudo, evidenciando a interação entre os materiais utilizados na síntese.

De acordo com os estudos de NORCINO *et al.* (2020) o comportamento térmico de filmes de pectina foi modificado com a adição do óleo de copaíba, haja vista o surgimento do pico de degradação em aproximadamente 370°C, relacionado a fração resinosa do óleo. Por isso, acredita-se na inclusão do óleo na matriz polimérica da pectina evidenciando boa compatibilidade entre os constituintes do filme.

Ainda sobre isso, YOSHIDA *et al.* (2021) evidenciaram em seus estudos que o DSC de filmes de quitosana contendo extratos de *Aloe vera* apresentaram temperaturas mais elevadas para a degradação da quitosana, principalmente quanto maior teor de *Aloe vera*, indicando melhor estabilidade da quitosana associada com o aumento do extrato vegetal.

Para KIMURA *et al.* (2016) os picos exotérmicos de decomposição do óleo de andiroba combinado com a quitosana atingiram temperaturas entre 235°C à 268°C relacionado a eliminação de triglicerídeos e ácidos graxos como os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoléico do óleo de andiroba. Observaram ainda uma sequência de vários eventos exotérmicos acima de 350°C que pode estar associado a degradação completa de cadeias dos ácidos graxos.

Mediante esses dados, a adição do óleo, por nanoemulsão, exibiu melhores efeitos na redução da degradação térmica da quitosana sugerindo melhor estabilidade desse método de síntese quando comparada com as membranas de quitosana preparadas por emulsão do óleo.

4.3.6 Capacidade de absorção de fluido/percentual de intumescimento

O percentual de intumescimento, em 24 horas, das membranas de quitosana por emulsão do óleo de copaíba após imersão na água são apresentados na Figura 23.

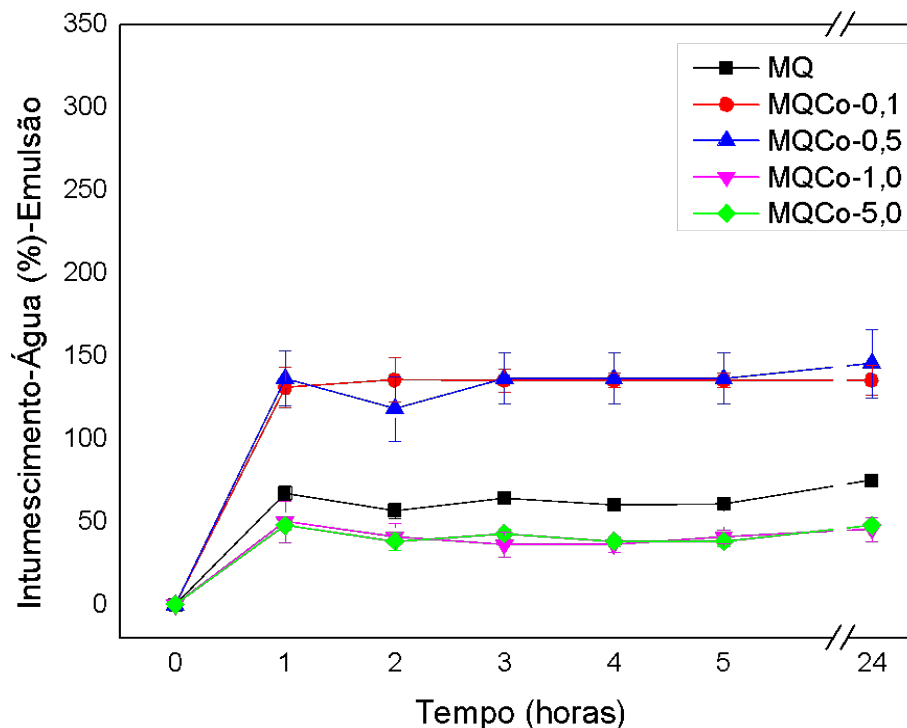


Figura 23- Percentual de intumescimento das membranas de quitosana sem óleo (MQ) e membranas de quitosana por emulsão do óleo, em meio aquoso em função do tempo.

Pode-se observar que as membranas de quitosana por emulsão do óleo tiveram um crescimento do percentual de intumescimento em água no tempo analisado.. No entanto, os melhores resultados dos percentuais ocorreram com as composições com baixos teores do óleo.

Ao comparar os percentuais, a membrana de quitosana sem óleo (MQ) apresentou melhor percentual de intumescimento ($75 \pm 3,0\%$), em 24 horas de imersão. As composições com altos teores do óleo obtiveram percentuais abaixo da MQ, enquanto em menor quantidade do óleo, o valor do percentual atingiu valores acima da MQ.

Para a composição contendo $1,0\%$ (v/v) de emulsão do óleo, o valor do percentual de intumescimento foi mais baixo ($45 \pm 7,0\%$) quando comparado com a composição de $5,0\%$ (v/v) de emulsão do óleo ($47 \pm 2,6\%$). Entretanto, parece que os baixos teores do óleo influenciaram fortemente no aumento dos valores de intumescimento. O maior percentual atingido foi obtido pela composição contendo $0,5\%$ (v/v) de emulsão do óleo ($145, \pm 20\%$), em relação a membrana com $0,1\%$ (v/v) de emulsão ($135, \pm 9,0\%$).

Na figura 24, são mostrados os percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por emulsão do óleo de copaíba, em 24 horas, após imersão em PBS.

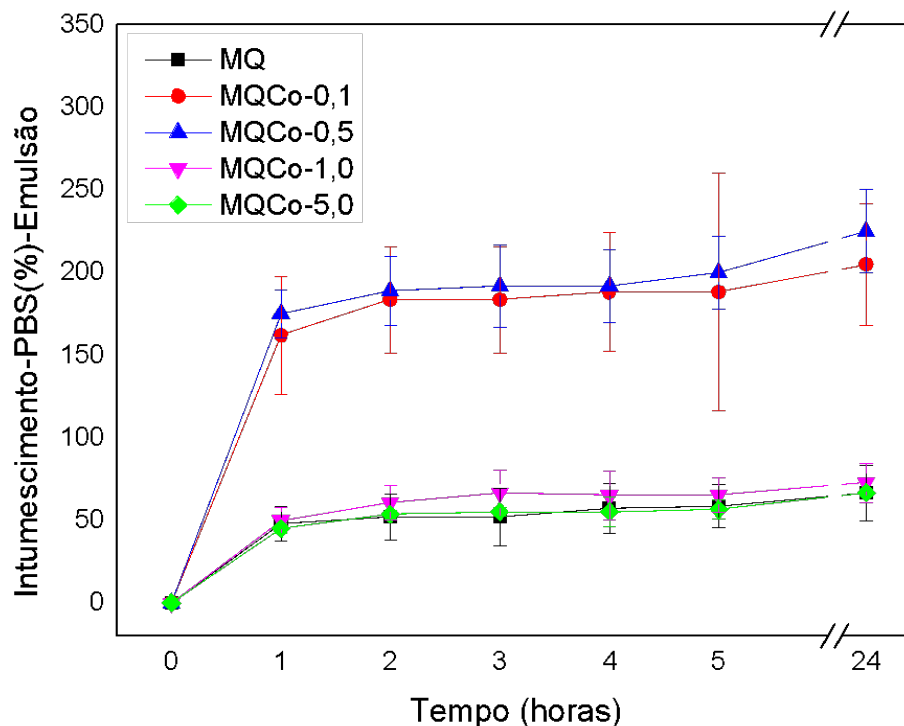


Figura 24- Percentual de intumescimento da membrana de quitosana sem óleo(MQ) e membranas de quitosana por emulsão do óleo, imersos em PBS, em função do tempo.

Em relação, à imersão em PBS, os percentuais de intumescimento foram maiores quando se compara com a imersão das composições na água, com exceção à MQ, que obteve parâmetro maior quando imerso neste fluido.

Em contato com a solução de PBS, MQ apresentou 66%(±17) de intumescimento, com maior resultado em 24 horas de imersão. Quando níveis diminuídos do óleo foram acrescentados na quitosana, esses percentuais foram acima da MQ. No entanto, o melhor crescimento foi obtido para a composição com 0,5%(v/v) de emulsão do óleo (225±25%) quando comparado com a composição contendo 0,1% (v/v) do óleo por emulsão (204±37%).

Todavia, esse comportamento parece diminuir na medida em que maiores quantidades do óleo foram adicionados na quitosana. Então, percentuais mais baixos foram atingidos para as composições com 1,0%(v/v) e 5,0%(v/v) do óleo emulsionado. Mas, o menor percentual foi obtido quando se obteve 5,0%(v/v) por emulsão do óleo (66,±2,0%) em relação a composição contendo 1,0%(v/v) da emulsão do óleo (72,±12%).

O estudo em questão mostrou que a quitosana possui melhor afinidade com água em relação ao PBS. Um dos motivos dessa divergência foram explicados no estudo de

ASSIS e SILVA (2003), os quais sugerem que a absorção entre as soluções utilizadas para imersão decorre, provavelmente, pela diferença de polaridade existente entre a água e o PBS. Afirmam ainda que a quitosana possui melhor interação com a água devido à forte afinidade por moléculas polares, em função de seus grupamentos amina e hidroxila. Por isso, a absorção da membrana de quitosana foi relativamente mais satisfatória na água.

Por outro lado, pode-se inferir que a adição do óleo de copaíba por emulsão em teores mais baixos do óleo melhorou a capacidade de absorção da quitosana tanto na água como na solução em PBS. Isto pode estar relacionado com a estrutura porosa destas composições que pode ter favorecido a entrada de líquidos na rede polimérica.

Todavia, a maior a quantidade do óleo dificultou o intumescimento da membrana de quitosana em ambas as soluções, sugerindo pouca porosidade ou inibição da quitosana na absorção da água devido maior hidrofobicidade dessas composições.

Por isso, acredita-se que esse resultado pode ter sido influenciado pela microestrutura heterogênea que diferiu entre as composições, o que pode promover resultados diferentes de intumescimento das membranas por emulsão do óleo. Apesar disso, o resultado desse estudo pode ser considerado bom, uma vez que as membranas produzidas por emulsão foram capazes de absorver fluidos. Para feridas exsudativas, o ideal são materiais com alto poder de absorção de fluidos corporais

Sobre isso, GUNES e TIHMINHOGLU (2017) concluíram, em seus estudos, que o aumento de intumescimento na película contendo óleo *H. perforatum* pode ser explicado pela formação de estrutura porosa com a adição do óleo na matriz polimérica, corroborando com os achados do presente estudo quando comparado com os resultados obtidos pelo MEV.

No entanto, PENG e LI (2014) obtiveram graus de intumescimento diminuídos em filmes de quitosana combinados com óleo de limão, tomilho e canela. Para esses autores a diminuição do intumescimento pode ser atribuída ao aumento da reticulação entre quitosana e os óleos hidrofóbicos. Esse fato pode justificar a diminuição do intumescimento de membranas com concentrações mais elevadas do óleo de copaíba no presente estudo.

Em relação ao uso desses materiais em feridas cutâneas, os resultados deste teste podem indicar que MQCo-1,0 e MQCo-5,0, com concentrações maiores do óleo de copaíba, podem ser mais favoráveis em feridas com pouco exsudato.

Em contrapartida, as MQCo-0,1 e MQCo-0,5, parecem ser mais apropriadas para feridas altamente exsudativas, procurando controlar a umidade local e, dessa forma, evitar o agravamento da lesão decorrente de maceração do tecido lesionado por acúmulo de exsudato.

Para comparar se houve diferença estatística significativa do percentual de intumescimento entre as membranas sintetizadas por emulsão do óleo, nas soluções (água x PBS) foi realizada a análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$, conforme mostrada na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados da análise de variância (ANOVA), fator único, realizada para avaliar o intumescimento das membranas por emulsão do óleo, após 24 horas de imersão na solução de água e PBS.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	115108,3997	9	12789,82219	43,02099639	3,81066E-11	2,392 81410 8
Dentro dos grupos	5945,851218	20	297,2925609			
Total	121054,2509	29				

*SQ: soma dos quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio.

O resultado mostra que o F calculado foi maior que o F crítico, e o quadrado médio entre os grupos foi maior que o quadrado médio dentro do grupo, com nível de significância à 5%. Conclui-se que existe pelo menos uma diferença significativa entre os percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por emulsão do óleo de copaíba imersas 24 horas na água e PBS.

Para validar os dados obtidos pelo teste estatístico de variância para único fator, aplicou-se o método estatístico de Tukey para identificar as membranas sintetizadas por emulsão com diferença significativa entre os resultados de intumescimento, imersas em água e PBS, após 24 horas de análise. Foi encontrado o valor igual a 31,7050 correspondente ao d.m.s (diferença mínima significativa). Os resultados do teste de Tukey estão no Anexo A.

Na Figura 25, são mostradas as composições das membranas de quitosana preparadas por emulsão com diferença estatística significativa analisada pelo teste de Tukey, após 24 horas de imersão em água e PBS.

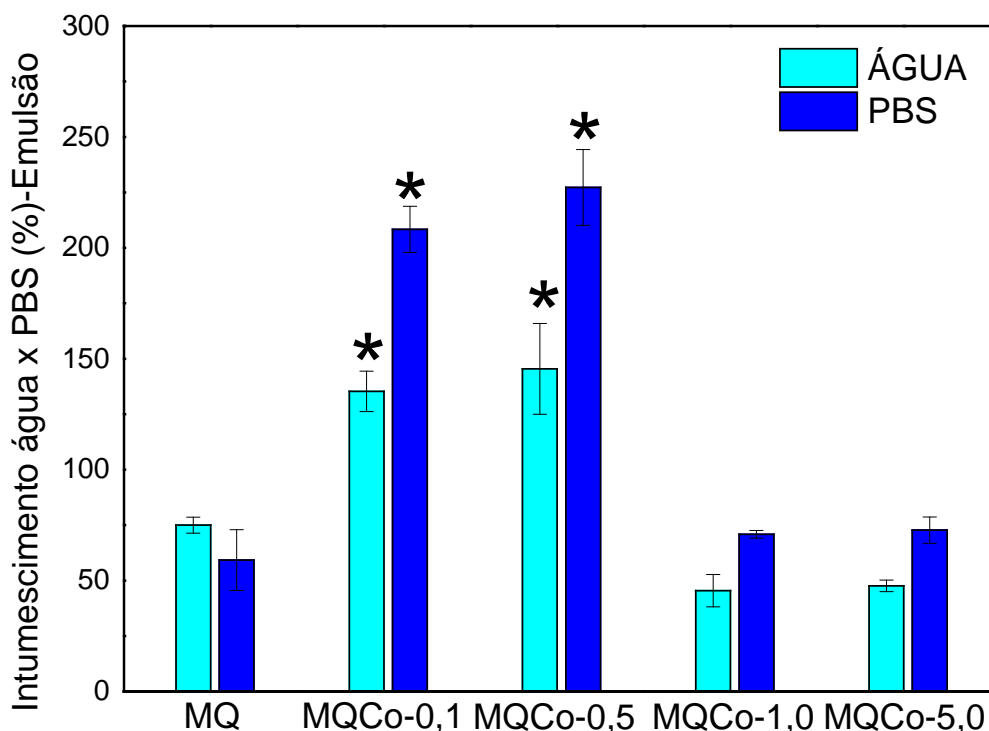


Figura 25- Comparação dos percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por emulsão do óleo, após 24 horas de imersão na água e PBS. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

Com base no resultado do teste de Tukey, constatou-se que as membranas de quitosana preparadas com 0,1%(v/v) e 0,5 %(v/v) do óleo de copaíba por emulsão (MQCo-0,1 e MQCo-0,5) em solução de PBS demonstraram estatisticamente diferença entre as membranas sintetizadas, sugerindo maior capacidade de intumescimento na solução em PBS ao comparar com a imersão na água. Esse resultado é favorável para materiais em contato com feridas, considerando que a solução PBS simula a composição dos fluidos corporais humanos.

Isso pode indicar que as membranas de quitosana (MQCo-0,1 e MQCo-0,5) podem ser apropriadas para feridas altamente exsudativas, procurando controlar a umidade local, e dessa forma evitar o agravamento da lesão decorrente de maceração do tecido lesionado por acúmulo de exsudato, portanto exigindo retirada frequente desse material em feridas.

Na Figura 26, são apresentados os percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba, imersas na água.

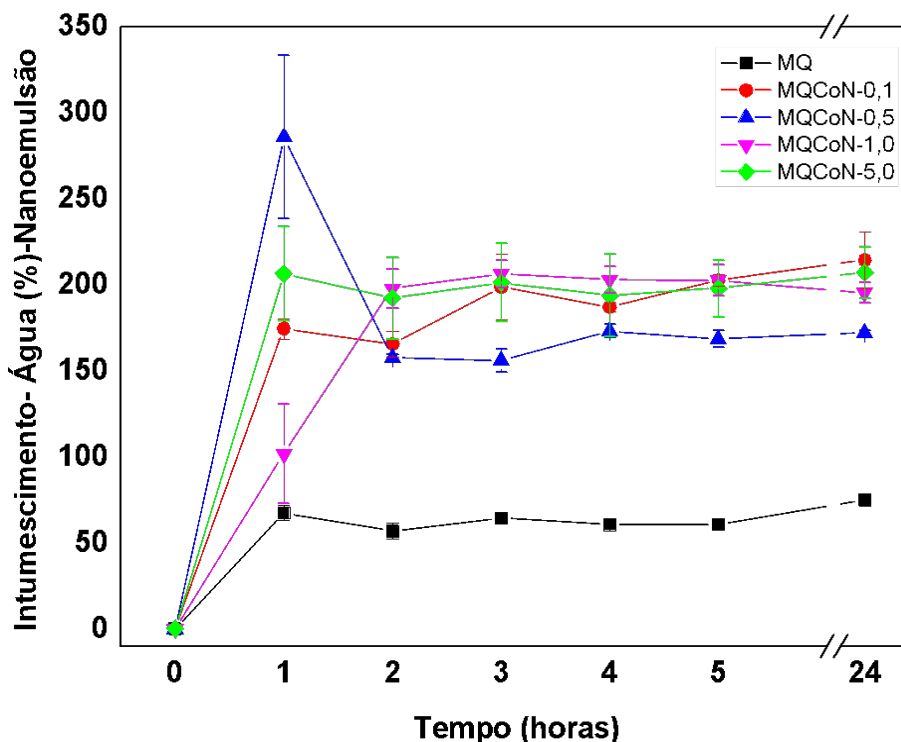


Figura 26- Percentual de intumescimento da membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo, em meio aquoso, em função do tempo.

Já as nanoemulsões, imersas na água, demonstraram melhores resultados de crescimento dos percentuais de intumescimento, em relação a MQ, no período de tempo analisado.

Na primeira hora, as composições com 0,5%(v/v) e 5,0%(v/v) do óleo nanoemulsionado tiveram um crescimento mais acentuado do percentual entre as composições (285, $\pm 47\%$ e 206, $\pm 27\%$), respectivamente, com queda dos valores no decorrer das análises.

Quando atinge a terceira hora, observa-se que a composição de quitosana contendo 1,0 % (v/v) do óleo por nanoemulsão consegue atingir o melhor valor de intumescimento (206, $\pm 8,0\%$). Para a composição de 0,1% (v/v) do óleo por nanoemulsão na quitosana, foi a única amostra a ter bons resultados dos percentuais, em 24 horas de imersão na água (214, $\pm 3,0\%$).

De modo geral, os maiores percentuais de intumescimento das membranas por nanoemulsão do óleo de copaíba na quitosana em ordem crescente, após 24h de imersão na água foram obtidas pelas composições: MQCoN-0,1 (214 $\pm 3,0\%$), MQCoN-5,0(207, $\pm 15\%$), MQCoN-1,0 (195, $\pm 6,0\%$) e MQCoN-0,5 (172, $\pm 1,0\%$).

Na Figura 27, são apresentados os percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo de copaíba, imersas em PBS.

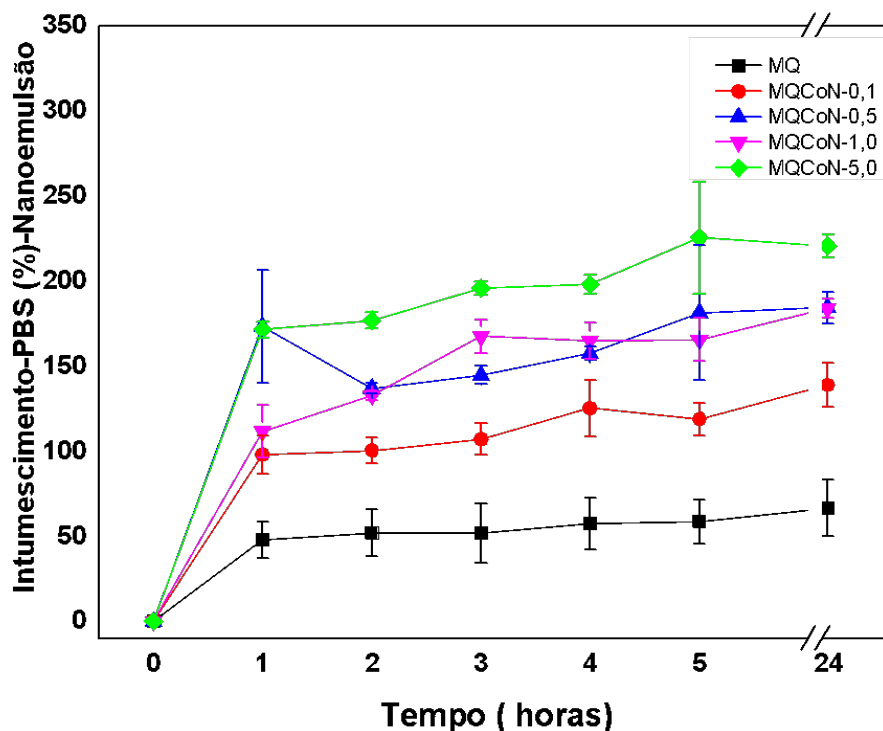


Figura 27- Percentual de intumescimento da membrana de quitosana sem óleo (MQ) e membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo, imersos em PBS, em função do tempo.

Em relação, a imersão em PBS, as nanoemulsões do óleo na quitosana apresentaram comportamento de crescimento do intumescimento acima do valor percentual da MQ.

Já, os resultados mais satisfatórios de intumescimento das nanoemulsões, em PBS, foram obtidos no período de 24 horas de análise. O valor do percentual mais elevado foi a composição contendo quitosana e 5,0%(v/v) do óleo por nanoemulsão (220, \pm 7,0%). Em seguida, as composições de quitosana e 0,5%(v/v) do óleo por nanoemulsão (184, \pm 9,0%) e quitosana com 1,0%(v/v) do óleo (183, \pm 5,0%). Por fim, a composição de quitosana com 0,1%(v/v) do óleo por nanoemulsão (138, \pm 13,0%).

Para comparar se houve diferença estatística significativa do percentual de intumescimento entre as membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo, nas soluções (água x PBS) foi realizada a análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$, conforme mostrada na Tabela 4.

Tabela 4- Resultados da análise de variância (ANOVA), fator único, realizada para avaliar o intumescimento das membranas por nanoemulsão do óleo, imersas por 24 horas na solução de água e PBS.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	82755,32802	9	9195,036447	79,91548587	1,05358E-13	2,392 81410
Dentro dos grupos	2301,19015	20	115,0595075			8
Total	85056,51818	29				

*SQ: soma dos quadrados; gl: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

O resultado mostra que o F calculado foi maior que o F crítico, e o quadrado médio entre os grupos foi maior que o quadrado médio dentro do grupo, com nível de significância à 5%. Conclui-se que existe pelo menos uma diferença significativa entre os percentuais de intumescimento das membranas, indicando que houve efeito no intumescimento das membranas por nanoemulsão do óleo imersas 24 horas na água e PBS.

Foi aplicado o método de Tukey para confirmação dos dados relacionados ao teste estatístico de variância (ANOVA), de único fator, para identificar entre as membranas de quitosana preparadas por nanoemulsão do óleo de copaíba, àquela que demonstrou estatisticamente diferença significativa entre os resultados de intumescimento, imersas em água e PBS, após 24 horas de análise. Foi encontrado o valor igual a 31,0269 correspondente ao d.m.s (diferença mínima significativa). O resultado do teste de Tukey, comparando as diferenças entre as amostras estão apresentados em tabela no Apêndice B.

Na Figura 28, são mostradas as composições com diferença estatística significativa, após teste de Tukey, em relação ao percentual de intumescimento entre as membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo na solução (água e PBS) após 24 horas de imersão.

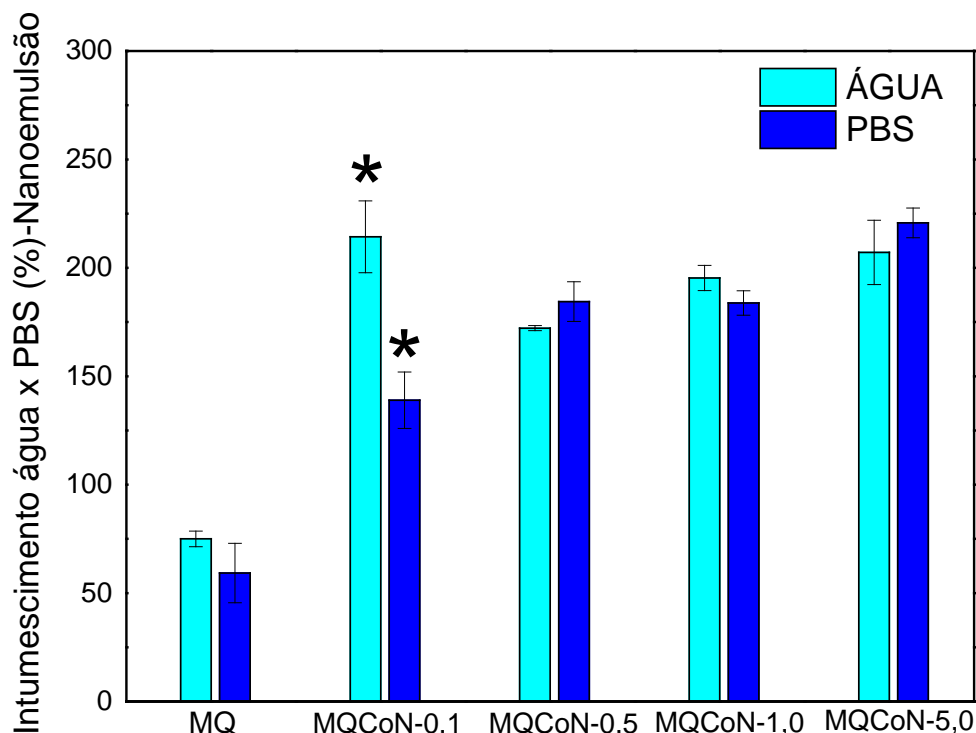


Figura 28- Comparação dos percentuais de intumescimento das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo, imersas 24 horas na solução (água e PBS). (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

O resultado do teste de Tukey aponta que o intumescimento, em soluções diferentes (água e PBS), da amostra com 0,1%(v/v) do óleo por nanoemulsão são diferente estatisticamente entre si.

A respeito disso, BRÁS *et al.* (2020) relacionam a diminuição da capacidade volumétrica de intumescimento ao caráter hidrofóbico do extrato *Cynara cardunculus*, que pode ser atribuída a presença de fração lipídica na composição, dificultando na absorção de fluidos, o que pode ser apropriado para curativos onde uma sorção excessiva de fluidos não é desejada.

Mas, de acordo com ALENCAR *et al.* (2015), a interação com óleos naturais é mais favorável se houver um sistema de emulsificação do óleo, com uso de surfactantes para melhorar suas características de permeabilidade, biodisponibilidade e liberação dos componentes ativos do óleo.

Por isso, acredita-se que a síntese por nanoemulsão do óleo de copaíba melhorou o intumescimento das membranas ao comparar com as membranas sintetizadas por emulsão. Esse comportamento pode ter sido relacionado pela melhor distribuição homogênea das gotas do óleo na solução de quitosana associado com o tamanho em nanômetros das gotas.

Portanto, as membranas por nanoemulsão do óleo parecem mais vantajosas, dada ao comportamento satisfatório de absorção de fluidos. Para materiais de curativos, estas membranas podem ser mais indicadas no tratamento de feridas com grandes volumes de líquidos corporais.

4.3.7. Determinação do percentual de umidade

Os valores relacionados ao teor de umidade das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão do óleo e por nanoemulsão estão expressos em percentuais e descritos na Tabela 5.

Tabela 5- Percentual de umidade das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba.

Membranas	Percentual de umidade (%)
MQ	21 ±1,18
MQCo-0,1	18 ± 2,45
MQCo-0,5	11 ±1,13
MQCo-1,0	10 ±0,25
MQCo-5,0	19 ±1,12
MQCoN-0,1	0,8 ± 1,37
MQCoN-0,5	3,0 ± 0,79
MQCoN-1,0	12 ± 2,02
MQCoN-5,0	10 ± 1,50

De maneira geral, observou-se que a adição do óleo na quitosana, sintetizadas por emulsão e nanoemulsão das membranas, parece ter influenciado na diminuição do percentual de umidade, ao comparar com a membrana de quitosana sem óleo. Todavia, as membranas sintetizadas por nanoemulsão, apresentaram-se efeitos de diminuição de umidade mais pronunciadas.

Ao comparar as membranas produzidas por emulsão e nanoemulsão, de mesmos componentes e concentrações, foi possível notar que houve diferença entre os percentuais de umidade. No entanto, pode-se observar que apenas a composição com 1,0%(v/v) do óleo por nanoemulsão não apresentou diferença entre os percentuais.

Em relação às membranas sintetizadas por emulsão, os principais percentuais de diminuição de umidade foram as amostras compostas por 0,5 e 1,0% (v/v) do óleo.

Para as amostras por nanoemulsão, os compostos contendo 0,1 e 0,5% (v/v), obtiveram os resultados dos percentuais de diminuição de umidade mais expressivos.

O teste de variância (ANOVA), fator único, foi realizado para verificar a existência da diferença estatística significativa entre os percentuais de umidade das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e por nanoemulsão do óleo. Os dados gerados pelo teste estatístico estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6- Resultados da análise da variância (ANOVA), fator único, realizada para avaliar o percentual de umidade entre as membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo.

Fonte da variação	SQ	gl	QM	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1195,786691	8	149,4733364	70,97568925	4,93818E-12	2,510 15789 5
Dentro dos grupos	37,90762843	18	2,105979357			
Total	1233,69432	26				

*SQ: soma dos quadrados; gl: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Esse resultado do teste de variância (ANOVA), por fator único, confirmou que há diferença estatística significativa entre as membranas sintetizadas, visto que o F calculado foi maior que o F crítico, assim como o quadrado médio entre os grupos foi maior que o quadrado médio dentro do grupo, com nível de significância à 5%. Estes dados significam que existe pelo menos uma membrana com percentual de umidade que diferem entre as demais amostras, apontando que o óleo modificou tais valores.

A validação do teste de variância (ANOVA) foi realizada pelo teste de Tukey para comparação das médias de cada membrana e identificação da diferença entre elas. Esses resultados estão descritos no Anexo C. Foi calculado o d.m.s, com valor de 4,156.

Na Figura 29, é mostrado o resultado do teste de Tukey, ao comparar a média de umidade entre a membrana de quitosana sem óleo e a média das demais membranas preparadas por emulsão do óleo de copaíba.

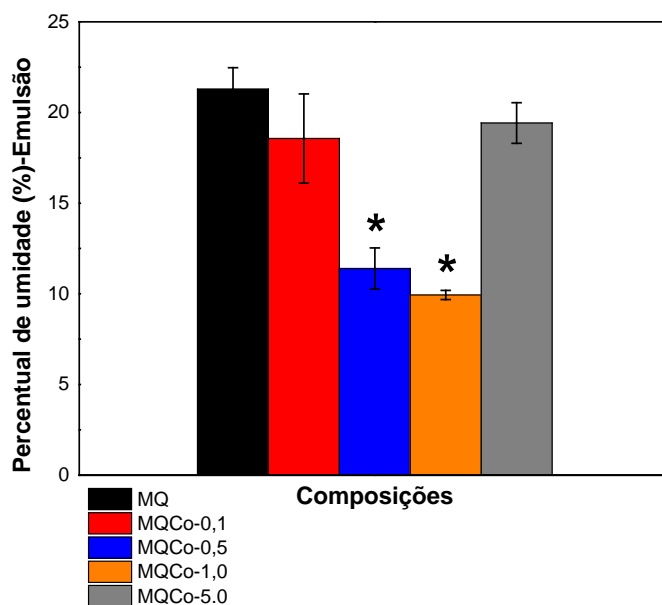


Figura 29- Comparação dos percentuais de umidade entre a membrana de quitosana sem óleo e as membranas de quitosana por emulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

O resultado do teste de Tukey apontou que as membranas sintetizadas por emulsão do óleo nas concentrações de 0,5%(v/v) e 1,0%(v/v) diferem estatisticamente da membrana de quitosana sem óleo (MQ), sugerindo que o processo de síntese utilizando emulsão nestes percentuais influenciou no teor de umidade das membranas.

Na Figura 29, é mostrado o resultado do teste de Tukey, entre a membrana de quitosana sem óleo e as membranas preparadas por nanoemulsão do óleo de copaíba.

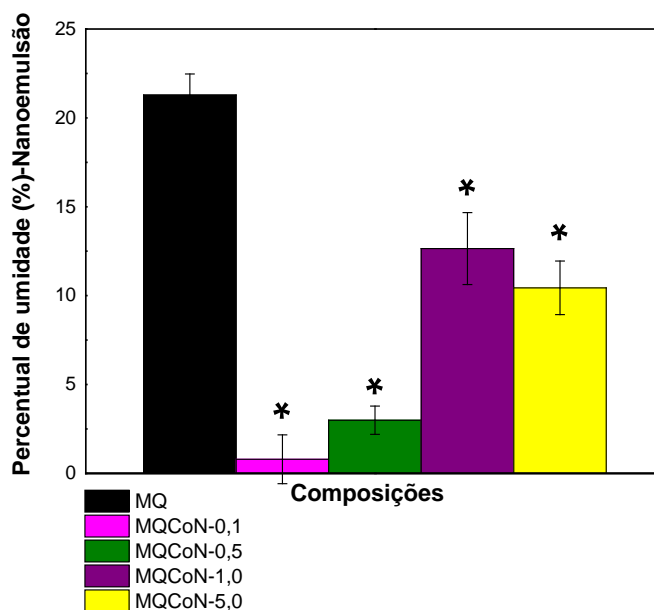


Figura 30- Comparação dos percentuais de umidade entre a membrana de quitosana sem óleo e as membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

Verificou-se no teste de Tukey que todas as membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo diferem estatisticamente da membrana de quitosana sem óleo (MQ), mostrando que o processo de síntese utilizando nanoemulsão influenciou fortemente no teor de umidade das membranas.

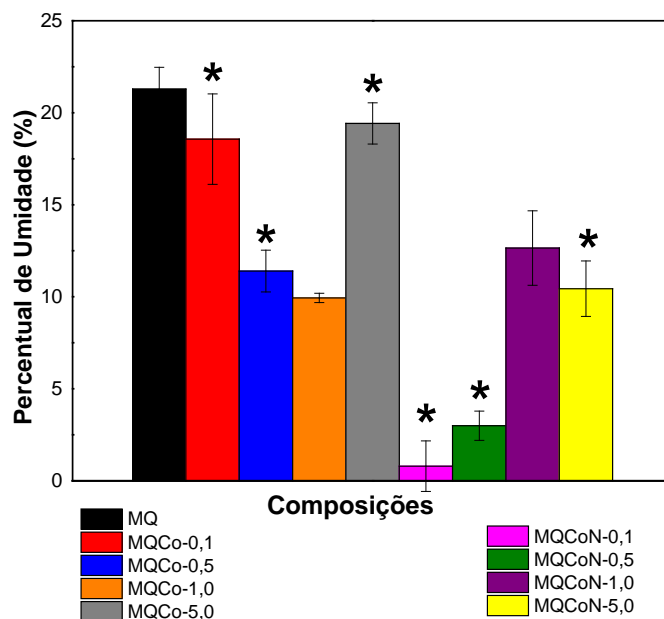


Figura 31- Comparação dos percentuais de umidade entre a membrana de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

Ao comparar os percentuais de umidade das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo, de mesma concentração, observou-se que houve diferença significativa de umidade entre as composições, exceto as membranas compostas por 1% (v/v) do óleo de copaíba que não apresentaram diferença estatística entre si.

Segundo os estudos de DASHIPOUR *et al.* (2015) o teor de umidade do filme à base de carboximetilcelulose diminuiu completamente quando o óleo essencial de *Zataria multiflora* foi incorporado. Esse resultado foi atribuído à redução da natureza hidrofílica dos filmes..

Na pesquisa de RODRIGUES *et al.* (2020) a adição do óleo de copaíba, direta e microencapsulada, reduziu a solubilidade dos filmes. Isso pode ser relacionado à redução do caráter hidrofílico dos filmes ocasionado pela interação entre os

componentes do óleo e os grupos hidroxila da matriz polimérica, que se tornam menos disponíveis e conseqüentemente melhora a resistência dos filmes à água.

Segundo KIMURA *et al.* (2016) e YOSHIDA *et al.* (2021) o teor de umidade controlado na ferida favorece o processo de cicatrização, portanto, faz-se necessário a troca de curativos em feridas com excesso de fluido para evitar maceração e infecção. Afirmam ainda, que feridas mais secas afetam o percurso natural da cicatrização. Por isso, oferecer um material para curativo com capacidade de absorção e controle de umidade ajudam a ferida a cicatrizar-se adequadamente.

Com base nos resultados apontados no presente teste, entende-se que as membranas compostas por nanoemulsões do óleo de copaíba, especialmente as de menores concentrações do óleo (0,1 % e 0,5 % v/v), devem ser priorizadas na síntese de biomateriais para tratamento de lesões por apresentarem maior possibilidade de capacidade hidratante e manutenção da umidade da lesão, aspecto importante no processo de cicatrização.

4.3.8 Determinação do ângulo de contato

Na Tabela 7 é apresentado o ângulo de contato das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e por nanoemulsão do óleo.

Tabela 7- Comparação do ângulo de contato das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo.

Membranas	Ângulo de contato (°)
MQ	67±2,56
MQCo-0,1%	83±3,78
MQCo-0,5%	81±5,65
MQCo-1%	38±4,97
MQCo-5%	65±2,77
MQCoN-0,1%	86±1,96
MQCoN-0,5%	49±1,55
MQCoN-1%	68±3,05
MQCoN-5%	57±2,38

Esses resultados mostram que as membranas sintetizadas, por emulsão e nanoemulsão apresentaram valores de ângulos de contato abaixo de 90°, indicando hidrofiliçidade da superfície das membranas.



Em relação a síntese das membranas por emulsão, pôde ser observada maiores valores do ângulo para as composições contendo 0,1 e 0,5% (v/v) do óleo, em $83 \pm 4^\circ$ e $81 \pm 5^\circ$, respectivamente, evidenciando que a adição do óleo, nessas concentrações, contribuiu para o aumento da natureza hidrofóbica da superfície das membranas.

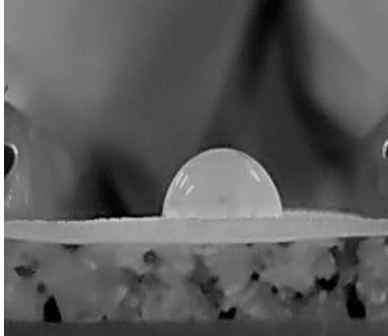
Entretanto, constatou-se baixos valores de ângulo de contato das composições do óleo por emulsão em 1,0 e 5,0%(v/v), para $38 \pm 5^\circ$ e $65 \pm 3^\circ$, respectivamente, demonstrando comportamento mais hidrofílico dessas membranas oleosas.

Quando comparado com as nanoemulsões do óleo, o valor do ângulo de contato é diferente entre as composições. O ângulo maior verificou-se na composição com 0,1% (v/v) do óleo, com $86 \pm 2^\circ$, apontando a amostra com caráter menos hidrofílico. Mas, esse comportamento foi diferente para as demais composições do óleo por nanoemulsão. Para as amostras contendo 0,5%, 1,0% e 5,0% (v/v) os valores do ângulo foram iguais a $49 \pm 1,55^\circ$, $67 \pm 3^\circ$ e $57 \pm 2^\circ$, respectivamente.

Na Tabela 8, são exibidas imagens de algumas composições com resultados de ângulos de contato.

Tabela 8- Comparação do teste da gota séssil para análise do ângulo de contato.

Imagem	Composição	Ângulo de contato ($^\circ$)
	MQ	67°
	MQCo-0,5	81°

	MQCoN-0,5	49°
---	-----------	-----

Estes dados demonstram a gota de água formando o ângulo de contato na superfície das membranas de quitosana sem óleo e com óleo. Observa-se que a membrana controle, obteve ângulo de 66°, evidenciando a característica hidrofílica da quitosana.

Constatou-se ângulo de contato igual a 81° da membrana de quitosana com 0,5%(v/v) do óleo por emulsão, demonstrando um caráter mais hidrofóbico da membrana quando comparada com a membrana de quitosana sem óleo. Por sua vez, o ângulo igual a 49° da membrana de quitosana por nanoemulsão do óleo na concentração de 0,5%(v/v) foi revelada a membrana com superfície mais hidrofílica.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada, com a finalidade de investigar a diferença estatística significativa entre as médias dos valores de ângulo de contato das membranas de quitosana sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo. Os resultados do teste, fator único, foram apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliar os valores do ângulo de contato entre as membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo.

Fonte da variação	SQ	gl	QM	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	6181,306667	8	772,6633333	65,1975436	1,02723E-11	2,510 15789 5
Dentro dos grupos	213,32	18	11,85111111			
Total	6394,626667	26				

*SQ: soma dos quadrados; gl: grau de liberdade; QM: quadrado médio.

Como o F calculado foi maior que o F crítico, e o quadrado médio entre os grupos foi maior que o quadrado médio dentro do grupo, ao nível de significância à 5%,

confirmou-se que há diferença estatística entre as membranas. Esse resultado evidencia que há pelo menos uma diferença estatística significativa entre as membranas, por emulsão e nanoemulsão, quanto aos valores de ângulo de contato, evidenciando que o óleo de copaíba foi capaz de modificar a molhabilidade da superfície.

Para validar os dados do teste de variância (ANOVA), fator único, aplicou-se o teste de Tukey para identificar as membranas com diferença estatística significativa entre os resultados dos valores do ângulo de contato. Foi encontrado o valor igual a 9,858, correspondente ao d.m.s (diferença mínima significativa). O resultado do teste de Tukey, comparando as diferenças entre as amostras estão apresentados em tabela no Apêndice B.

Na Figura 32, é mostrado o resultado do teste de Tukey, ao comparar a média do ângulo de contato entre a membrana de quitosana sem óleo e a média das demais membranas preparadas por emulsão do óleo de copaíba.

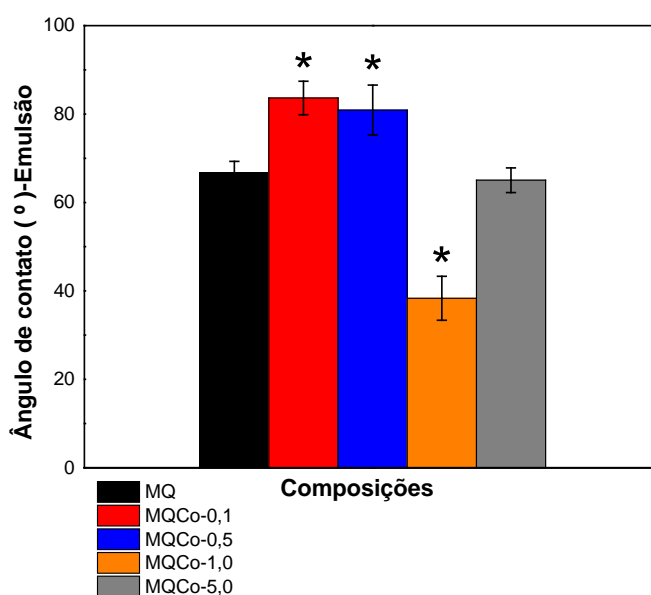


Figura 32- Comparação do ângulo de contato entre a membrana de quitosana sem óleo (MQ) e as membranas de quitosana por emulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

Verificou-se pelo teste de Tokey que as membranas sintetizadas por emulsão nas concentrações 0,1% (v/v), 0,5%(v/v) e 1,0% (v/v) do óleo demonstraram que existem diferença estatística significativa com a membrana de quitosana sem óleo.

Na Figura 33, é mostrado o resultado do teste de Tukey, do ângulo de contato entre a membrana de quitosana sem óleo e as membranas por nanoemulsão do óleo.

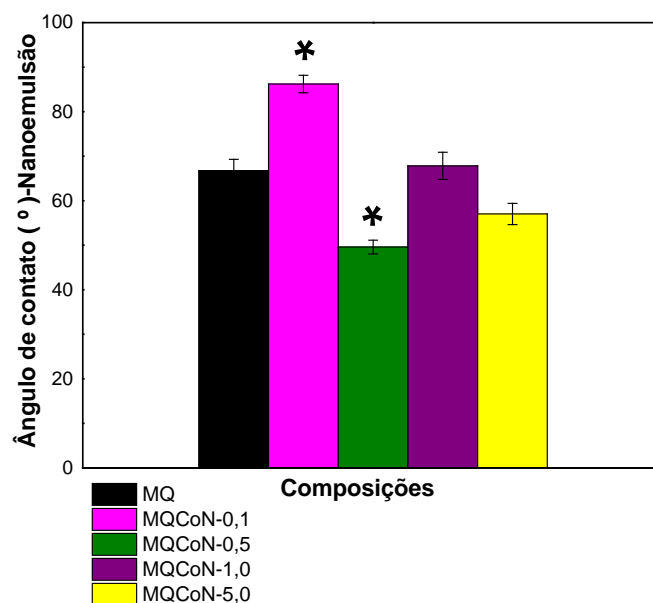


Figura 33- Comparação do ângulo de contato entre a membrana de quitosana sem óleo (MQ) e as membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

Para as membranas sintetizadas por nanoemulsão, o teste de Tokey mostrou que as concentrações 0,1% (v/v) e 0,5%(v/v) do óleo foram as membranas que apresentaram diferença estatística significativa ao comparar-se com a membrana de quitosana sem óleo.

Na Figura 34, é mostrado o resultado do teste de Tukey, ao comparar a média do ângulo de contato entre a membrana de quitosana sem óleo e a média das demais membranas preparadas por emulsão e nanoemulsão do óleo.

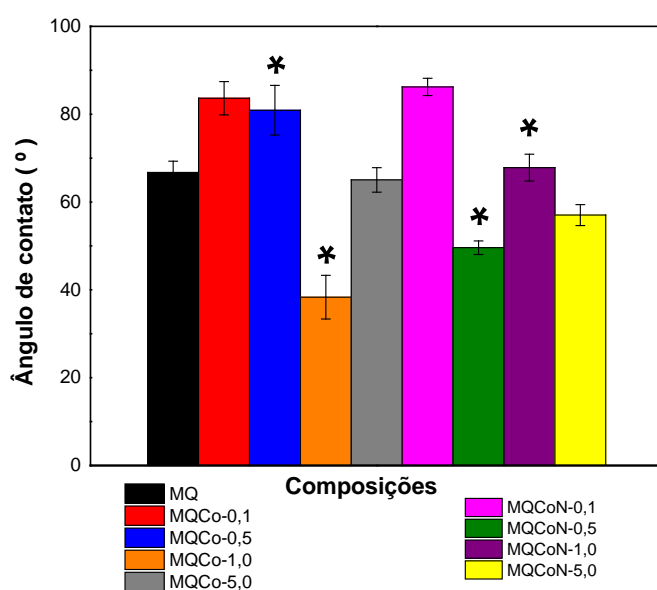


Figura 34-Comparação do ângulo de contato entre a membrana de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo. (*) O asterisco significa as composições com diferença estatística significativa.

Ao comparar as membranas sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo, de mesmas concentrações, o teste de Tukey evidenciou uma diferença significativa entre as composições contendo 0,5%(v/v) e 1,0% do óleo.

Levando em consideração os métodos de síntese, por emulsão e nanoemulsão, da adição do óleo de copaíba, pode-se sugerir que houve pouca influência no ângulo de contato entre as membranas. Esses resultados divergentes entre as sínteses e composições pode estar diretamente relacionada com a microestrutura heterogênea produzida durante o processo de síntese. Para tanto, esse fato mostra a necessidade de investigação de métodos de síntese envolvendo óleo vegetal para melhorar a natureza hidrofóbica das membranas estudadas.

A hidrofiliçidade é uma propriedade importante no campo biomédico, pois a molhabilidade afeta a interação das células com os materiais em que estão em contato (BARRIONI *et al.*, 2015). Os filmes hidrofílicos empregados como curativo possibilitam a permeabilidade seletiva e a manutenção da umidade da ferida que contribui para o processo de regeneração das células, além de minimizar as dores devido ao ressecamento de terminações nervosas.

Pensando sobre isso, MACHADO (2017) aponta que a superfície do material interfere no seu caráter hidrofílico/hidrofóbico, visto que superfícies mais lisas, podem resultar em maior área de contato para o sólido e a água, e superfícies ásperas levam à menor área de contato devido à presença de bolhas de ar presas na interface, gerando elevados valores de ângulos de contato.



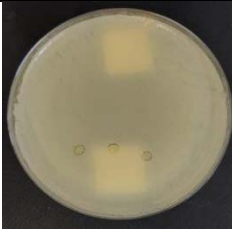


Valores de ângulos de contato para materiais contendo óleo de copaíba são descritos por BONAN *et al.* (2015), que relatam um aumento do ângulo de contato ($120,35 \pm 0,46^\circ$) de nanofibras de poli (ácido láctico)/polivinilpirrolidona devido à presença deste óleo-resina, que gera um caráter hidrofóbico. Segundo MACHADO (2017) o óleo de copaíba, por ser de natureza hidrofóbica, pode favorecer a redução da hidrofiliçidade dos filmes poliméricos.




Portanto, entende-se que, no aspecto de molhabilidade e hidrofiliçidade da superfície do material, o ideal para tratar feridas, foram as sínteses das membranas de quitosana preparadas por emulsão com 1,0%(v/v) do óleo de copaíba (MQCo-1,0) e 0,5% (v/v) por nanoemulsão do óleo (MQCoN-0,5).

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

A atividade antibacteriana, testada frente à bactéria *S.aureus*, das membranas sintetizadas, por emulsão e nanoemulsão estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela10- Teste de atividade antibacteriana, em meio sólido contendo *S.aureus* das membranas de quitosana por emulsão e nanoemulsão do óleo.

Imagem	Composição	Atividade antibacterina	Diâmetros de Inibição (mm)
	MQ	+	7,7
	Quitosana/ Copaíba 0,1% (MQCo-0,1)	+	6
	Quitosana/Copaíba 0,5% (MQCo-0,5)	+	6
	Quitosana/Copaíba 1,0% (MQCo-1,0)	+	6
	Quitosana/emulsão de copaíba 0,5 % (MQCo-5,0)	+	4

	Quitosana/Nanoemulsão de copaíba 0,1 % (MQCoN-0,1)	-	-
	Quitosana/Nanoemulsão de copaíba 0,5 % (MQCoN-0,5)	+	4
	Quitosana/Nanoemulsão de copaíba 5 % (MQCoN-5,0)	+	4

Foi possível observar uma resposta antibacteriana favorável das membranas estudadas, contra a cepa gram positiva *S.aureus*, vistas pela zona de inibição nas placas contendo as amostras.

A maior atividade antibacteriana foi constatada na membrana de quitosana sem óleo (MQ), podendo observar efeito mais eficaz na diminuição do crescimento celular da cepa analisada, ao comparar com as membranas constituídas do óleo.

A inibição bacteriana parece diminuir com a adição do óleo de copaíba na quitosana, por emulsão e nanoemulsão. Ao comparar com a MQ, observou que a síntese das membranas por emulsão do óleo, apresentou efeito antibacteriano diminuído. O comportamento de inibição bacteriana foi semelhante para as composições MQCo-0,1, MQCo-0,5 e MQCo-1,0. Mas, para MQCo-5,0, esse efeito antibacteriano foi mais diminuído entre as membranas por emulsão.

Quando compara a MQ com as membranas sintetizadas por nanoemulsão, percebeu diferença na atividade antibacteriana entre as composições. A composição contendo MQCoN-1,0 foi a segunda membrana a demonstrar melhor efeito antibacteriano. Entretanto, a composição contendo quitosana e 0,1%(v/v) do óleo por nanoemulsão, aparentemente, não demonstrou nenhum efeito inibitório. Para as demais composições, MQCoN-0,5 e MQCoN-5,0, foram exibidos menores efeitos antibacterianos.

Segundo MATICA *et al.* (2019) o mecanismo de ação da quitosana na inibição do crescimento microbiano está relacionado com a presença de seus grupos amínicos que são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, modificando atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e consequentemente inibição microbiana .

Quanto aos efeitos antibacterianos do óleo de copaíba, MARANGON *et al.* (2017) desenvolveram em seus estudos emulsões formuladas com óleo incorporado à quitosana e gelatina. Tais composições foram capazes de inibir infecções por *S.aureus*.

A nanobiotecnologia melhora propriedades biológicas do óleos vegetais. A esse respeito, ALENCAR *et al.* (2015) conseguiram mostrar que o óleo nanoestruturado potencializou a capacidade antimicrobiana em infecções de pele.

Para LUCCA *et al.* (2015) esses efeitos aumentados do óleo nanoestruturado na capacidade de absorção na pele, estão relacionados possivelmente com a entrega melhorada dos constituintes bioativos do óleo.

Tal fato foi observado por RODRIGUES *et al.* (2020) ao avaliar filmes poliméricos incorporados com óleo de copaíba, na forma direta e microencapsulada. Os resultados mostraram que o óleo encapsulado foi capaz de inibir as bactérias gram-positivas, indicando que esse método de encapsulamento foi mais eficiente para proteger os compostos bioativos do óleo.

MORELLI *et al.* (2015) confirmaram atividade antibactericida contra a bactéria gram positiva, *Bacillus subtilis*, com óleo de copaíba incorporado em filmes de poli-ácido-lático (PLA).

Aparentemente, no estudo em questão, o efeito antibacteriano foi melhor nas membranas produzidas por emulsão, pois provavelmente as produzidas por nanoemulsões podem ter apresentado maior dispersão do óleo e parcial solubilização, o que pode ter interferido na capacidade de inibição do crescimento bacteriano. Além disso, pode ter havido aprisionamento dos componentes bioativos diminuindo a capacidade antibacteriana.

Mediante os dados apresentados do estudo antibacteriano, pode-se supor efeito inibitório presente nas membranas estudadas por emulsão e nanoemulsão em relação a bactéria *S.aureus*, exceto a composição MQCoN-1,0 que não produziu nenhuma atividade antibacteriana.

5 CONCLUSÃO

- Foram obtidas membranas à base de quitosana, por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba em diferentes proporções.
- Os principais componentes químicos identificados no óleo de copaíba foram os compostos cariofileno, alfa-trans-bergamoteno e beta-bisaboleno.
- A emulsificação ultrassônica do óleo de copaíba resultou em tamanho de gotículas do óleo em escalas nanométricas e dispersão homogênea do óleo no sistema, visto pelo DLS.
- Quanto à morfologia, as membranas de quitosana sintetizadas por emulsão, apresentaram aparência heterogênea, amareladas, pouca maleabilidade e bom manuseio. Para as nanoemulsões do óleo foram observadas aparência homogênea, cor levemente amarelada, boa manuseabilidade e pouco maleáveis. Comparando as sínteses e composições, a síntese por nanoemulsão produziram membranas com melhores características macroscópicas como a coloração, homogeneidade e continuidade, exceto a MQCoN-5,0.
- Quanto à análise microestrutural, o MEV mostrou que a síntese em emulsão do óleo modificou a superfície das membranas com surgimento de microporos influenciados pela concentração oleosa, exceto a MQCo-0,1. Mas, a síntese por nanoemulsão do óleo aumentou a quantidade de porosidade dispersas nas superfícies das membranas. Ao comparar as sínteses, o MEV, demonstrou que as nanoemulsões influenciaram fortemente nas mudanças microestruturais devido a porosidade mais numerosa e distribuição mais homogênea na superfície das membranas.
- Os espectros de DRX mostraram que a emulsão do óleo de copaíba na quitosana, associada com a concentração oleosa, influenciaram na diminuição da cristalinidade da quitosana. Estruturas menos cristalina foi também observada nas membranas de quitosana sintetizadas por nanoemulsão do óleo. A adição do óleo de copaíba por nanoemulsão proporcionou maior amorficidade das membranas sintetizadas quando comparadas com a síntese por emulsão, portanto mais indicadas para tratar feridas, devido maior influência bioativa no processo cicatricial.
- Quanto ao FTIR, a síntese por emulsão e nanoemulsão proporcionou inclusão dos componentes oleosos na quitosana. Todavia, nanoemulsões evidenciaram melhor interação com constituintes do óleo de copaíba.

- Na análise termogravimétrica, por DSC, demonstraram que a síntese por emulsão e nanoemulsão do óleo favoreceram a estabilidade das membranas sintetizadas. No entanto, os efeitos dessa estabilidade foram melhorados pela obtenção das membranas de quitosana por nanoemulsão.
- O intumescimento das membranas de quitosana, por emulsão do óleo, apresentaram capacidade de absorção nas soluções utilizadas (água e PBS), entretanto os percentuais foram melhores alcançados na água. As nanoemulsões do óleo intumesceram satisfatoriamente quando imersas em água e o PBS. Ao comparar, os percentuais de intumescimento, a síntese por nanoemulsão do óleo apresentaram melhores taxas de crescimento de absorção de fluidos.
- O percentual de umidade foi levemente influenciado pela síntese de emulsão do óleo de copaíba, mostrando-se membranas com pouca umidade. As nanoemulsões do óleo modificaram a umidade das membranas sintetizadas, mantendo-se mais úmidas, portanto, mais hidratadas. A síntese das membranas de quitosana por nanoemulsão do óleo apresentaram comportamento de umidade mais satisfatórios em relação às sintetizadas por emulsão.
- Quanto ao ângulo de contato, houve pouca influência entre os métodos de síntese por emulsão e nanoemulsão do óleo. As composições MQCo-1,0 e a MQCoN-0,5 foram as membranas com comportamento mais hidrofílico.
- As membranas sintetizadas por emulsão e nanoemulsão foram capazes de inibir o crescimento bacteriano *S.aureus*, exceto a MQCoN-1,0.
- As membranas de quitosana produzidas em nanoemulsões podem ser mais indicadas para aplicação em feridas agudas, crônicas, exsudativas e infectadas pela bactéria *S. aureus*.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar novos métodos de síntese de emulsão do óleo de copaíba incorporado na quitosana.
- Realizar teste de permeação cutânea.
- Realizar testes mecânicos das membranas sintetizadas.
- Avaliar citotoxicidade das membranas produzidas através de estudos *in vitro*.
- Replicar o teste antibacteriano por difusão em ágar das membranas sintetizadas.
- Realizar outros métodos mais sensíveis de atividade antibacteriana.
- Realizar teste *In vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M. O. P., BITTENCOURT, O. L., MENDES, S.F.P., *et al.*, 2020, “Safety and effectiveness of copaiba oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on inflammation and tissue repair of oral wounds in rats”, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, pp. 3568. Available in: <<https://doi.org/10.3390/ijms21103568>>. Access on: 14 Nov. 2020, 13: 05: 30.

ABD EL-HACK, M. E., MOHAMED, T. E. S. M. E., SHAFIC, M.Z., *et al.*, 2020, “Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review”, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, pp. 2726-2744. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>>. Access on: 15 nov. 2020, 17: 05: 20.

AHMED, S; IKRAM, S., 2015, “Chitosan & its derivatives: a review in recent innovations”, **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 1, pp. 14. Available in: <<http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>>. Access on: 11 aug. 2020.

AHMED, S; IKRAM, S., 2016, “Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing”, **Achievements in the life sciences**, v. 10, n. 1, pp. 27-37. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>>. Access on: 11 aug. 2020.

ABRÃO, F., SILVA, T. S., MOURA, C.L., *et al.*, 2021, “Oleoresins and naturally occurring compounds of *Copaifera* genus as antibacterial and antivirulence agents against periodontal pathogens”, **Scientific reports**, v. 11, n. 1, pp. 1-13. Available in: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84480-7>>. Access on: 23 feb. 2019.

ALENCAR, E.N., XAVIER-JUNIOR, F. H., MORAIS, A. R., *et al.*, 2010, “Chemical Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of Natural Oil Nanostructured Emulsions”, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n.1, pp. 880–888. Available in: <<http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2015.9187>>. Access on: 14 jan. 2019.

ALENCAR, E. N. *et al.*, 2015, “Chemical Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of Natural Oil Nanostructured Emulsions”, **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**. v. 15, n. 1, pp. 880-888. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/117294> >.

ALTIOK, D., ALTIOKI, E., TIHMINLIOGLU, F., 2010, “Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications”, **J Mater Sci: Mater Med**, v. 21, n.7, pp. 2227–2236. Available in: <<https://doi.org/10.1007/s10856-010-4065-x>>. Access on: 21 oct. 2020.

AMES-SIBIN, A. P., BARIZÃO, C. L., CASTRO -GHIZONI, C.V.S., *et al.*, 2018, “ β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats”, **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 12, pp. 10262-10277. Available in: <<https://doi.org/10.1002/jcb.27369>>. Access on: 15 oct. 2020.

ANITHA, A., SOWMYA, S., KUMAR, P. S., *et al.*, 2014, “Chitin and chitosan in selected biomedical applications”, **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, pp. 1644-1667. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008>>. Access on: 17 sep. 2020.

ARRUDA, C. *et al.*, 2019, “Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on Copaifera genus—A review”, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, [s.n] p.p. 1-20. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.030>. Access on: 14 de apr. 2022.

BARADARAN, F. R., MAGHSOUDNIA, N., SAMIMI, S., F. *et al.*, 2019, “Application of chitosan in oral drug delivery”. In: **Functional Chitosan**. Springer, Singapore, [s.v], [s.n], pp. 43-73. Available in: <<https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-72>>. Access on: 22 sep. 2021.

BARRIONI, B. R., *et al.*, 2015. “Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications”, **Materials Science and Engineering C**, n. 52, p. 22–30. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.027>. Access on: 04 de apr. 2022.

BASSERI, H., HASHEMI, S. J., BANJARDELANI, M., *et al.*, 2019, “Antibacterial/antifungal activity of extracted chitosan from American cockroach (Dictyoptera: Blattidae) and German cockroach (Blattodea: Blattellidae)”, **Journal of medical entomology**, v. 56, n. 5, pp. 1208-1214. Available in: <<https://doi.org/10.1093/jme/tjz082>>. Access on: 28 sep. 2020.

BECKER, G., RUSCO, I., CASOTI, R., *et al.*, 2020, “Copaiba oleoresin has topical antinociceptive activity in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice”, **Journal of ethnopharmacology**, v. 250, [s.n], pp. 112-176. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112476>>. Access on: 10 sep. 2020.

BIONDO-SIMÕES, M. L.P. *et al.* 2019, “Comparative analysis of the effects of honey, copaiba oil-resin and a commercial product (fibrinolysin, deoxyribonuclease and chloramphenicol) on second intention healing, in rats”, **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões [online]**, v. 46, n. 5 . Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-6991e-20192245>. Acesso em 02 de mar de 2022.

BONAN, R. F. *et al.*, 2015. “ In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (Copaifera sp.) oil”, **Materials Science and Engineering C** , n. 48, p. 372-377. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021>. Access on: 08 apr. 2022.

BONILLA, J., ATARÉS, L., VARGAS, M., *et al.*, 2012, “Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films”, **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, pp. 9-16. Available in:<<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.03.015>>. Access on: 15 oct. 2020.

BOSE, S., KE, D., SAHASRABUDHE, H., *et al.*, 2018, “Additive manufacturing of biomaterials”, **Progress in Materials Science**, v . 93, [s.n], pp. 45-111.

BRAZ, E.M.A., *et al.* 2018. “Modified chitosan-based bioactive material for antimicrobial application: Synthesis and characterization”, **International Journal of Biological**

Macromolecules, v.117, [s.n], pp. 640-647. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac>. Acesso em 21 de fev de 2022.

CATANZANO, G.G.A. et al. 2021, “PEG-crosslinked-chitosan hydrogel films for in situ delivery of *Opuntia ficus-indica* extract, Carbohydrate Polymers”, **Carbohydrate polymers**, v. 264, [s.n], pp.117987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117987>>. Acesso em 13 de fev de 2022.

CAVALCANTI NETO, A. T. *et al.*2005, “Comparative evaluation between copaiba oil-resin and chlorhexidine digluconate on wound healing”, **Histological study in rats. Rev Odontol UNESP**, v. 34, n. 2, p. 107-12. Disponível em:
<https://www.revodontolunesp.com.br/article/588017af7f8c9d0a098b4856>. Acesso em 02 de mar de 2022.

CHANG, S. H., LIN, H. T. V., WU, G. J., *et al.*, 2015, “pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan”, **Carbohydrate polymers**, v. 134, [s.n], pp. 74-81. Available in:
<<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.072>>. Access on: 10 oct. 2020.

CHAUDHARI, A.A., VIG, K., BAGANIZI, D.R., *et al.*, 2016, “Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review”, **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, pp. 1974. Available in:
<<https://doi.org/10.3390/ijms17121974>>. Access on: 22 sep. 2020.

CHEN, F.M., LIU, X., 2016, “Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering”, **Progress in polymer science**, v. 53, [s.n] pp. 86-168. Available in:
<<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>>. Access on: 12 sep. 2020.

CHOUHAN, D., DEY, N., BHARDWAJ, N., *et al.*,2019, “Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances”. **Biomaterials**, v. 216, [s.n], pp. 119267. Available in: <
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119267>>. Access on: 10 sep. 2020

CLEN, A., 2010, “A current perspective on leishmaniasis”, *Journal of global infectious diseases*, v.2, n. 2, pp.124–126. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62863>. Acesso em 20 de fev de 2022.

CORPO Humano, 2013, “Sistema tegumentar”, **Website**. Disponível em: <https://corpohumano1.webnode.pt/sistemas/sistema-tegumentar-2/>>. Acesso em 10 de abr. 2021.

DASHIPOUR, A. *et al.*, 2015. “Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil”, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, pp. 606-613. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.006>. Access on: 14 apr. 2022.

DE MORAES, A. R. D. P., *et al.* 2018, “Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against Leishmania infantum and Leishmania amazonensis infections”, *Experimental Parasitology*, v. 187, [s.n.], pp. 12-21, ISSN 0014-4894, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.005>.

DEBONE, H. S., LOPES, P. S., SEVERINO, P., *et al.*, 2019, “Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application”, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, [s.n] pp. 146-152. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.054>>. Access on: 22 sep. 2020.

DEMIDOVA-RICE, T. N., HAMBLIN, M. R., HERMAN, I. M., 2012, “Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care”, *Advances in skin & wound care*, v. 25, n. 7, pp. 304–314. Available in: <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0>>. Access on: 01 sep. 2020.

DESJEUX, P. 1996, “Leishmaniasis. Public health aspects and control.” **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, pp. 417-23. doi:10.1016/0738-081x(96)00057-0.

DHIVYA, S., PADMA, V. V., SANTHINI, E., 2015, “Wound dressings - a review”. **BioMedicine**, v. 5, n. 4, pp. 1- 5. Available in: <<https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>>. Access on: 23 dec. 2020.

DIAS, F. G. G., *et al.* 2017, “Use of *Copaifera multijuga* for acute corneal repair after chemical injury: A clinical, histopathological and toxicogenetic study”, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, pp. 1193-1198. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.099>. Acesso em 02 de mar de 2022.

DIAS, F.G.G., PEREIRA, L.F., FURTADO, R.A., *et al.*, 2021, “Topical formulations containing *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin improve cutaneous wound healing”. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 11, n. 2, pp. 120-133. Available in: <<https://www.magiran.com/paper/2232557/?lang=en>>. Access on: 12 dec. 2020.

DIAS, S.M.A., PEREIRA, A.C., MARIN, M.C., *et al.*, 2013, “The influence of topic and systemic administration of copaiba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats”. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 5, n.4, pp. 169–173. Available in: <<https://doi.org/10.4317/jced.51104>>. Access on: 10 dec. 2020.

DIAS, D. O., *et al.* 2014, “Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods”, **Industrial Crops and Products**, v.59, [s.n], p.p. 154-162. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.007>. Acesso em 17 de abr de 2022.

DOMANSKY, R.C., BORGES, E.L., 2014, “**Manual para prevenção de lesões de pele: recomendações baseadas em evidências**”. 2 ed. Rio de Janeiro, Editora Rubio.

ELSABEE, M. Z., ABDOU, E. S., 2013, “Chitosan based edible films and coatings: A review”, **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, pp. 1819-1841. Available in: <<https://www.sciencedirect.com/science/journal/09284931>>.Access on 10 jan. 2021.

EMING, S.A.; MARTIN, P.; TOMIC. C. M, 2014, “ Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation”, **Sci Transl Med.**, v.6, [s.n], pp. 265-266. Available in: <<https://stm.sciencemag.org/content/6/265/265sr6/tab-pdf>>. Access on: 13 jan. 2021, 02: 08: 20.

FENG, P., LUO, Y., KE, C., *et al.*, 2021, “Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications”. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v.9, n. 650598, pp. 1-15. Available

in:<<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.650598>>. Access on: 11 aug. 2020.

FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. P. S. 2007,” Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)”, **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1–2, pp. 150-154. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.035>. acesso em 01 de mar de 2022.

GENESI, B. P., 2015, **Desenvolvimento de curativo a base de quitosana e gelatina contendo óleo de copaíba para tratamento de queimados**. Dissertação, Mestrado de Ciência dos Materiais, Universidade Federal de São Saulo, São Paulo, SP.

GIRI, T. K., THAKUR, A., ALEXANDER, A., *et al.*, 2021, “Fabrication of chitosan oligomer-coated electrospun polycaprolactone membrane for wound dressing application”. **Materials Science and Engineering: C**, [s.n], v. 120, pp. 111-724.

GIRI, T. K., THAKUR, A., ALEXANDER, A., *et al.*, 2012, “Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications”. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 5, pp. 439-449.

GONZAGA, V. A. M., **Desenvolvimento de membranas Porosas à Base de Quitosana e Laponita para tratamento de lesões de pele**. Tese de Doutorado em Ciências, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

GONZALES, K. , FUCHS, E., 2017, “Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche”, **Developmental cell**, v. 43, n. 4, pp. 387–401. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.10.001>>. Access on: 10 oct. 2020.

GRADA, A., MERVIS, J., FALANGA, V., 2018, “Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing”, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, [s.n],

pp. 2095-2105. Available In: <https://www.jidonline.org/action/showPdf?pii=S0022-202X%2818%2932481-3>. doi:10.1016/j.jid.2018.08.005. Access on: 13 jan. 2021.

GRANDE TOVAR, C. D. *et al.* 2020. Synthesis, Characterization, and Histological Evaluation of Chitosan-Ruta Graveolens Essential Oil Films, **Molecules**, v. 25, n. 7, pp.1688. Available In: <https://doi.org/10.3390/molecules25071688>. Access on: 12 nov. 2021.

GUNES, S., TIHMMNHOGLU, F., 2017, “Hypericum perforatum incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material”, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, [s.n], pp. 933-943.

GUEST, J. F., AYOUB, N., MCILWRAITH, T., *et al.* 2015, “Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK”, **BMJ open**, v. 5, n. 12, pp. 1-8. Available in: <<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009283>>. Access on: 11 aug. 2020

GUSHIKEN, L.F.S., BESERRA, F.P., BASTOS, J.K., *et al.*, 2021, “Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies”, **Life**, v. 11, n. 7, pp. 665. Available in: <<https://doi.org/10.3390/life11070665>>. Access on: 12 sep. 2020.

HARPER, D. , YOUNG, A. , McNAUGHT, C. 2014, “The physiology of wound healing”, **Surgery (Oxford)**, v. 32, n. 9, pp. 445-450. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.06.010>. Acesso em: 02 de marc de 2022.

HASSAN, M. A., TAMER, T. M., VALACHOVÁ, K., *et al.*, 2021, “Antioxidant and antibacterial polyelectrolyte wound dressing based on chitosan/hyaluronan/phosphatidylcholine dihydroquercetin”. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, [s.n], pp. 18-31.

HE, P., ZHAO, J., ZHANG, J., *et al.*, 2018, “Bioprinting of skin constructs for wound healing”. **Burns & Trauma**, v. 6, n.5, pp.1-10. Available in: <<https://doi.org/10.1186/s41038-017-0104-x>>. Access on: 17 sep. 2020.

IBRAHIM, N. I., WONG, S. K., MOHAMED, I. N. *et al.*, 2018, “Wound Healing Properties of Selected Natural Products”, **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15. n. 11, pp. 2360-2373. Available in:

<https://doi.org/10.3390/ijerph15112360>. Access on: 19 sep. 2020.

IGE, O.O., UMORU, L.S., ARIBO, S., 2012, “Natural products: a minefield of biomateriais”, **International Scholarly Research Network Materials Science**, v. 12, [s.n], pp. 1-21.

Available in: <<https://doi.org/10.5402/2012/983062>>. Access on: 22 sep. 2020.

ISAAC, C., LADEIRA, P.R.S., RÊGO, F. M. P., *et al.*, 2010, “Processo de cura em feridas: cicatrização fisiológica”, **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 89, n. ¾, pp. 125-31.

Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/46294/49950>. Acesso em: 14 de abr de 2021.

ISLAM, S., BHUIYAN, M.A.R., ISLAM, M.N., 2017, “Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering”. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, n. 3, pp. 854-866. Available in: <<https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>>. Access on: 23 sep. 2020.

JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., KUMAR, P.S., *et al.*, 2011, “Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications”, **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, pp. 322-337. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>>. Access on: 22 sep. 2020.

JAISWAL, M., DUDHE, R., SHARMA, P.K. 2015. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. 3 **Biotech**, v. 5, n. 2, pp. 123–127. Available in:

<https://doi.org/10.1007/s13205-014-0214-0>. Access on: 23 abr. 2022.

JUNIOR, V.V., ROSAS, E.C., CARVALHO, M.V.D., *et al.*, 2007, “Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne- A comparative study”, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n.2, pp. 248-254.

KENAWY, E., OMER, A.M., TAMER, T.M., M.A., et al., 2019. Fabrication of biodegradable gelatin/chitosan/cinnamaldehyde crosslinked membranes for antibacterial wound dressing applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, pp. 440-448. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.191>. Access on: 26 de Jun. 2022.

KIMURA, V.T., MIYASATO, C.S., GENESI, B.P., *et al.*, 2016, “The effect of andiroba oil and chitosan concentration on the physical properties of chitosan emulsion film”, **Polímeros**, v. 26, n. 2, pp. 168-175. Available in: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282016000200168&lng=en&nrm=iso. Access on: 23 Apr. 2021

KURITA, K., 2006, “Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans”. **Marine biotechnology**, v. 8, n. 3, pp. 203-226. Available in: <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>. Access on: 24 sep. 2020

KULINETS, I., 2015, “Biomaterials and their applications in medicine In: Regulatory affairs for biomaterials and medical devices”, **Woodhead Publishing**, [s.v], [s.n], pp. 1-10.

LEANDRO, L.M. et al. 2012, “Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins”, **Molecules**, v. 17, n. 4, p.p. 3866-89. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules17043866>. Acesso em 14 de abr de 2022.

LIMA, L. R. **Caracterização e avaliação da atividade biológica de micropartículas de quitosana contendo óleos essenciais**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2019.

LIMA, L.R., et al. 2021, “Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium* x

ssp and *Copaifera officinalis*”, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, [s.n], pp. 1361-1370.

LIMA, M. C. F., SILVA, L. S., VEIGA JUNIOR, V. F., WIEDEMANN, L. S. M. 2020. “Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno para o controle de qualidade dos óleos de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)”, **Brazilian Journal of Development**, v.6, n. 1, pp. 608-623.

LIU, H., WANG, C., LI, C., *et al.*, 2018, “A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing”, **RSC advances**, v. 8, n. 14, pp. 7533-7549. Available in: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c7ra13510f>>. Access on: 22 sep. 2020.

LUCCA, L.G., MATOS, S.P., KREUTZ, T., *et al.*, 2018, “Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne)”, **Pharm. Sci. Tech.**, v. 19, [s.n], pp. 522–530. Available in: <<https://doi.org/10.1208/s12249-017-0862-6>>. Access on: 12 sep, 2020.

LUCCA, L.G., MATOS, S. P., BORILLE, B. T., *et al.*, 2015, “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, [s.n], pp 144-148. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.013>>. Access on: 22 sep. 2020

MACHADO, R. R. L., 2017. **Produção e Caracterização de Filme de Poliuretano Termoplástico com Óleo de Copaíba para Potencial Aplicação como Curativos**. Trabalho de Conclusão de Curso- Graduação em Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais.

MADNI, A., KOUSAR, R., NAEEM, N.N., *et al.*, 2021, “Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering”. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 6, n. 1, pp. 11-25. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.002>>. Access on: 22 sep. 2020.

MALES, Z., DRVAR, D.L, DUKA, I., *et al.*, 2019, “Application of medicinal plants in several dermatovenerological entities”, **Acta Pharmaceutica**, v. 69, n.4 pp.525-531.

Available in: < <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0045>>. Access on: 05 nov. 2021.

MARTINI, C. A. N. *et al.* 2016, “Comparative analysis of the effects of Copaifera multijuga oil-resin and nitrofurazona in the cutaneous wound healing process”, **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões [online]**, v. 43, n. 6, pp. 445-451. Available from:

<<https://doi.org/10.1590/0100-69912016006006>>. ISSN 1809-4546.

<https://doi.org/10.1590/0100-69912016006006>. Acesso em 02 de mar de 2022.

MARANGON, C.A., MARTINS, V.C., LEITE, P.M., *et al.*, 2017, “Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria”, **Industrial Crops and Products**, v. 99, [s.n], pp. 163-171.

MARTINS,C.S.; MORGADO, D.L.; ASSIS, O. B.G., 2016, “Cashew Gum-Chitosan Blended Films: Spectral, Mechanical and Surface Wetting Evaluations”, **Macromol. Res.**, v. 24, n. 8, 2016, pp. 691-697. Disponível em: <https://af.booksc.eu/book/61068631/b6288b>. Acesso em 11 de fevereiro de 2022.

MAZUR, K. L. *et al.* 2019, “Diethyldithiocarbamate loaded in beeswax-copaiba oil nanoparticles obtained by solventless double emulsion technique promote promastigote death in vitro”, **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v.176, pp.507–512. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.048>. acesso em 01 de março de 2022.

MOEINI, A., PEDRAM, P., MAKVANDI, P., *et al.*, 2020, “Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review”,

Carbohydrate Polymers, v. 233, n. 115839, pp. 115- 139. Available in:

<<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>>. Access on: 01 nov. 2021.

MOORE, A.L., MARSHALL, C.D., BARNES, L. A., *et al.*, 2018, “Scarless wound healing: transitioning from fetal research to regenerative healing Wiley Interdisciplinary Reviews”,

Developmental Biology, v. 7, n. 2, pp. 251-263. Available in:

<<https://doi.org/10.1002/wdev.309>>. Access on: 03 nov. 2020.

MORAES, D. P. *et al.* 2018, “Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections”, **Experimental Parasitology**, v.187, pp.12–21. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.005>. acesso em: 28 de fev de 2022.

MORELLI, CAROLINA LIPPARELLI, *et al.*, 2015, “Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging”, **Industrial crops and products**, v. 70, pp. 134-141.

NORCINO, L.B., MENDES, J.F., NATARELLI, C.V.L., *et al.*, 2020, “Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for potential use as bio-based active packaging”, **Food Hydrocolloids**, v. 106, [s.n], pp.1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105862>.

OLIVEIRA, D.F.D., NASCIMENTO, T.P., RODRIGUES, C.H., *et al.*, 2020, “Antimicrobial potential of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae) against bubaline mastitis multiresistant isolates”. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 4, pp. 1-12. Rio de Janeiro, Available in: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652020000700941&lng=en&nrm=iso>. Access on 29 Apr. 2021.

OMS. *Leishmaniose magnitude do problema*. Disponível em:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/print.html .

[citado em 2010]. acesso em 28 de fev de 2022.

OUALLA-BACHIRI, W., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A., QUIÑONES-VICO, M. I., *et al.*, 2020, “From Grafts to Human Bioengineered Vascularized Skin Substitutes”, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, pp. 1-28. Available in:

<<https://doi.org/10.3390/ijms21218197>>. Access on: 11 aug. 2020.

PAIVA, L. A. F. *et al.* 2002, “Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives”, **Phytother**

Res., v. 16, n. 8, p. 737-739, 2002. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.1049>. Acesso em 02 de mar de 2022.

PANDEY, A.R., SINGH, U.S., MOMIN, M., *et al.*, 2017, “Chitosan: Application in tissue engineering and skin grafting”, **Journal of Polymer Research**, v. 24, n. 8, pp. 1-22.

Available in: <<https://doi.org/10.1007/s10965-017-1286-4>>. Access on: 11 aug. 2020.

PASCOAL, D.R.C.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.M.; VELOZO, E.S., *et al.*, 2017, “Copaíba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: A potential alternative topical antileishmanial treatment”, **J. Supercrit. Fluid.**, v. 129, [s.n], pp. 106-115. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.02.012>>. Access on: 17 aug. 2020.

PASCOAL, D.R., VELOZO, E.S., BRAGA, M.E., *et al.*, 2020, “Bioactive compounds of Copaifera sp. impregnated into three-dimensional gelatin dressings”, **Drug Deliv. and Transl. Res.**, v.10, n.6, pp. 1537–155. Available in: <<https://doi.org/10.1007/s13346-020-00797-2>>. Access on: 21 aug. 2020.

PASSERO, L., *et al.*, 2021, “The Potential of Traditional Knowledge to Develop Effective Medicines for the Treatment of Leishmaniasis”, **Frontiers in pharmacology**, v.12, [s.n.], pp. 1-33. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.690432>. acesso em: 22 de fev de 2022

PATRULEA, V., OSTAFE, V., BORCHARD, G., *et al.*, 2015, “Chitosan as a starting material for wound healing applications”, **Eur. J. Pharm.**, v. 97 (Pt B), [s.n], pp. 417-426.

Available: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>>. Access on: 21 jan. 2020.

PERIAYAH, M.H., HALIM, A.S., SAAD, A.Z., 2016, “Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research”, **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 19, pp. 39–42.

Available in: <<https://doi.org/10.4103/0973-7847.176545>>. Access on: 20 nov. 2020.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, Â.M., 2015, “Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado”, **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, pp. 957-971.

PIRES, V. G. A., MOURA, M. R., 2017, “Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial”, **Química Nova**, v. 40, n. 1, pp. 1-5. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160130>.

PIRES, V.G.A., 2016, **Incorporação de nanoemulsões do óleos essenciais de melaleuca, copaíba e limão em filmes de alginato de sódio para utilização como curativo**, 79 f. Dissertação, Mestrado de Ciência dos Materiais, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/138091>>. Acesso em: 15 nov, 2021.

RIBEIRO, D.M.L., CARVALHO, J.A.R., VALE, M.G.H.R., 2020, “Polysaccharide-based formulations for healing of skin-related wound infections: Lessons from animal models and clinical trials”, **Biomolecules**, v. 10, n. 1, pp. 63-74.

RIBEIRO, L.N.M. et al. 2020, Functional Hybrid Nanoemulsions for Sumatriptan Intranasal Delivery. **Frontiers in chemistry**, v. 8, [s.n], pp.47-57 Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.589503>. Acesso em 25 de fev de 2022.

RIDIANDRIES, A., TAN, J.T.M., BURSILL,C.A., 2018, “The Role of Chemokines in Wound Healing”. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, pp. 3217. Available in: < <https://doi.org/10.3390/ijms19103217>>. Access on: 10 feb. 2020.

ROCHA-FILHO, P. A. *et al.* 2014, “Nanoemulsions as a Vehicle for Drugs and Cosmetics”, **Nanosci. Technol**, v.1, n.5., pp. 1-5. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/bb4a/29fde6ae0319c97e458d60c67920c5b8e1c2.pdf>. acesso em 01 de mar de 2022

RODRIGUES, E. C.R., *et al.*, 2014, “Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (Copaifera duckei) oleoresin”, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, pp. 699-705. ISSN 0102-695X, <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.013>.

RODRIGUES, I.A., RAMOS, A.D.S., FALCÃO, D.Q., *et al.*, 2018, “Development of nanoemulsions to enhance the antileishmanial activity of *copaifera paupera* oleoresins”, **BioMed research international**, v. 2018, [s.n], pp,1-9. Available in: <<https://doi.org/10.1155/2018/9781724>>. Access on: 10 aug. 2020.

RODRIGUES, G.M., *et al.* 2020, “Antimicrobial Activity and GC-MS Profile of Copaiba Oil for Incorporation into *Xanthosoma mafaffa* Schott Starch-Based Films”, **Polymers**. v. 12, n. 12, pp. 2883. Available in: <<https://doi.org/10.3390/polym12122883>>.

RODRIGUES, E.D.C., FERREIRA, A.M., VILHENA, J.C., *et al.*, 2014, “Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin”, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, [s.n], pp. 699-705. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.013>>. Access on: 11 aug. 2020.

RODRIGUES, G. M., *et al.*, 2020. “Antimicrobial Activity and GC-MS Profile of Copaiba Oil for Incorporation into *Xanthosoma mafaffa* Schott Starch-Based Films”. **Polymers**, v. 12, n. 12, pp.2883. Available in: <https://doi.org/10.3390/polym12122883>. Access on: 26 apr.2022.

RODRIGUES, M., KOSARIC, N., BONHAM, C.A., *et al.*, 2017, “Wound healing: a cellular perspective”, **Physiological reviews**, v. 99, n.1, pp. 665-706. [Available in: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00067.2017>](https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00067.2017). Access on: 10 nov. 2021.

ROGER, M., FULLARD, N., COSTELLO, L., *et al.*, 2019, “Bioengineering the microanatomy of human skin”. **Journal of anatomy**, v. 234, n. 4, pp. 438–455. Available in: <<https://doi.org/10.1111/joa.12942>>. Access on: 11 sep. 2020.

SALAMA, H.E., AZIZ, M.S.A. , SABAA, M. W. 2019. Development of antibacterial carboxymethyl cellulose/chitosan biguanidine hydrochloride edible films activated with frankincense essential oil, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.139 , pp. 1162-1167. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.104>. Access on: 23 jun.2022.

SANTOS, A. O. et al. 2012, "Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis", **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, [s.n], pp. 1-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/898419>.

SANTOS, A. O. et al. 2008, "Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus" **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online]**. v. 103, n. 3, pp. 277-281. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000015>.

SANTOS, A.O. *et al.*, 2008, "Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*." **Journal of ethnopharmacology**, vol. 120, n. 2, pp. 204-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.007>. Acesso em 22 de fev de 2022.

SANTOS, A. O. *et al.*, 2011, "Leishmania amazonensis: effects of oral treatment with copaiba oil in mice", **Experimental parasitology**, v. 129, n. 2, pp.145–151. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.06.016>. Acesso em: 28 de fev de 2022.

SARABAHI, S., 2012, "Recent advances in topical wound care". **Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India**, v. 45, n. 2, pp. 379–387. Available in: <<https://doi.org/10.4103/0970-0358.101321>>. Access on: 14 sep. 2020.

SAGHAZADEH, S., RINOLDI, C., SCHOT, M., *et al.*, 2018, "Drug delivery systems and materials for wound healing applications", **Advanced drug delivery reviews**, v. 127, [s.n], pp. 138–166. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>>. Access on: 23 sep. 2020.

SERRA, M. B., BARROSO, W.A., SILVA, N.N.D., *et al.*, 2017, "From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing", **International Journal of Inflammation**, v. 2017, [s.n], pp.1-17.

SERENO, D., SILVA, A. C., MATHIEU-DAUDE, F., OUAISSI, A., 2007, "Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures", **Parasitology**

International, v. 56, [s.n.], pp.3-7. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.09.001>. Acesso em: 28 de fev de 2022.

SEVERINO, P., 2018, “Desenvolvimento e caracterização de membranas poliméricas incorporando óleo de sucupira (*Pterodon emarginatus*. Vog.)”. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 5, n. 1, pp. 47.

SILVA, D.F., LIMA, K.T., BASTOS, G.N., *et al.*, 2021, “PCL/Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aubl.) Hybrid Film for Wound Healing Applications”, **Polymers.**, v. 13, n. 1591, pp.1-15. Available in: <https://doi.org/10.3390/polym13101591>. Access on: 12 aug. 2020.

SINGH, M. R., SARAF, S., VYAS, A., *et al.*, 2013, “Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances”, **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 41, n. 3, pp. 202-212.

SINGH, R., SHITIZ, K., SINGH, A., 2017, “Chitin and chitosan: biopolymers for wound management”, **International Wound Journal**, v. 14, [s.n], pp. 1276-1289. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/iwj.12797>. Access on: 06 jan. 2020.

SOARES, D. C. *et al.* 2013, "Trans- β -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.)", **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, [s.n], pp. 1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/761323>. Acesso em 01 de mar de 2022.

SOUTO, E. B., RIBEIRO, A. F., FERREIRA, M. I., *et al.*, 2020, “New nanotechnologies for the treatment and repair of skin burns infections”. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, pp. 393-420.

SOBREIRA, T. G. P. *et al.*, 2020, “Structural aspects of chitosan/PVA spheres cross-linked with glutaraldehyde and submitted to different thermal treatments”, **Química Nova [online]**, v. 43, n. 9, pp. 1251-1257. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170613>. Acesso em: 10 de fev de 2022.

SHAH, J.B., 2011, “The history of wound care”, **The journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v. 3, n. 3, pp. 65–66.

SHARMA, S., BATRA, S., 2019, **Recent advances of chitosan composites in artificial skin: the next era for potential biomedical application**. In: Sumit. S; Sonali.B. 1 ed, Chapter 5, Elsevier, Singapura.

SHEIKHOLESLAM, M., WRIGHT, M.E.E. , JESCHKE, M.G., *et al.*, 2018, “Biomaterials for Skin Substitutes”, **Adv. Healthc. Mater** , v.7, [s.n], pp. 1–20.

SHI, C., WANG, C., LIU, H., *et al.*, 2020, “Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds”, **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, n.182, pp. 1-17.

SIVASHANKARI, P.R., PRABAHARAN, M., 2016, “Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering”, **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 93, [s.n], pp. 1382-1389.

SINGH, S., YOUNG, A. MCNAUGHT, C.E., 2017, “The physiology of wound healing”, **Surgery (Oxford)**, v. 35, n.9, pp. 473-477.

STODDART, M.J., 2011, **Mammalian cell viability: methods and protocols**. 1 ed. Humana Press. New York, NY, USA. Available in:
<<https://www.springer.com/gp/book/9781617791079>>. Access on: 15 Aug. 2020.

SUGUMAR, S.; MUKHERJEE, A. ; CHANDRASEKARAN, N. 2015, “Eucalyptus oil nanoemulsion-impregnated chitosan film: antibacterial effects against a clinical pathogen, *Staphylococcus aureus*, in vitro”, **International journal of nanomedicine**, v. 10, Suppl 1(Suppl 1), [s.n], pp. 67–75. <https://doi.org/10.2147/IJN.S79982>.

SUGUMAR, S., *et al.* 2014, “Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*”, **Bulletin of Entomological Research**, v. 104, n. 3, p.p. 393-402. Disponível em: <http://doi:10.1017/S0007485313000710>. Acesso em 15 de abr de 2022.

TAMER, T.M., HASSAN, M.A., VALACHOVÁ, K., *et al.*, 2020, “Enhancement of wound healing by chitosan/hyaluronan polyelectrolyte membrane loaded with glutathione: in vitro and in vivo evaluations”, **Journal of Biotechnology**, v.310, [s.n], pp.103-113.

TAKESHITA, S., ZHAO, S., MALFAIT, W.J., *et al.*, 2021, “Chemistry of Chitosan Aerogels: Three-Dimensional Pore Control for Tailored Applications”, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n.18, pp. 9828-9851.

TASSINARY, J., SINIGAGLIA, M., SINIGAGLIA, G., 2019, **Raciocínio clínico aplicado à estética facial**. 1ed. [s.l], Editora Estética experts.

TEIXEIRA, F.B., SILVA, R.B., LAMEIRA, O.A., *et al.*, 2017, “Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues”, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, pp. 1-8.

TOSCANO, C.M., SUGITA, T.H., ROSA, M.Q.M, *et al.*, 2018, “Annual Direct Medical Costs of Diabetic Foot Disease in Brazil: A Cost of Illness Study”, **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n.1, pp. 1-13. Available in: <<https://doi.org/10.3390/ijerph15010089>>. Access on: 10 sep. 2020.

TRINDADE, R., SILVA, J.K., SETZER, W.N., 2018, “Copaífera of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology”, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, pp. 1511. Available in: <<https://doi.org/10.3390/ijms19051511>>. Access on: 22 sep. 2020.

VALENZUELA, C., ABUGOCH, L., TAPIA, C. 2013. Quinoa protein–chitosan–sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties, **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n. 2, pp.531-537. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.010>>. Access on: 23 jun. 2022.

VELNAR, T., BAILEY, T., SMRKOLJ, V., 2009, “The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms” **Journal of International Medical**

Research, v. 37, [s.n], pp.1528–1542. Disponível em :

<https://doi.org/10.1177/147323000903700531>. Acesso em 02 de marc de 2022.

VIEIRA, R.C., 2008, “Influência do óleo de *Copaifera landsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho”, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 8, pp. 558-566.

VIEIRA, R.C., BOMBARDIERE, E., OLIVEIRA, J.J., *et al.*, 2020, “Elastic and biodegradable chitosan/agarose film revealing slightly acidic pH for potential applications in regenerative medicine as artificial skin graft”, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, [s.n], pp. 172-183.

VILAR JUNIOR, J.C., RIBEAUX, D.R., SILVA, C.A.A., *et al.*, 2016, “Physicochemical and antibacterial properties of chitosan extracted from waste shrimp shells”, **International journal of microbiology**, v. 2016, [s.n], pp. 1-7.

WALLACE, H.A., BASEHORE, B. M., ZITO, P.M., 2020, “Wound Healing Phases”, **In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)**. [s.l], Europepmc.

WANG, L. *et al.* 2011, “Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films”, **Journal of agricultural and food chemistry**, v.59, n. 23, pp.12411–12419. <https://doi.org/10.1021/jf203165k>.

WANG, Y., BEEKMAN, J., HEW, J., *et al.*, 2018, “Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring”, **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 123, [s.n], pp. 3-17.

WANG, Y., 2016, “Bioadaptability: An Innovative Concept for Biomaterials”, **Journal of Materials Science & Technology**, v. 32, n. 9, pp. 801-809.

WANG, W., XUE, C., MAO, X., 2020, “Chitosan: Structural modification, biological activity and application”, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, [s.n], pp. 4532-4546.

WANG, S., YAN, F., REN, P., *et al.*, 2020, “Incorporation of metal-organic frameworks into electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) nanofibrous membrane with enhanced antibacterial activity for wound dressing application”, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, [s.n], pp. 9-17.

WELLER, C. D., TEAM, V., SUSSMAN, G., 2020, “First-line interactive wound dressing update: a comprehensive review of the evidence”, **Frontiers in pharmacology**, v. 11, [s.n], pp. 155-165.

XAVIER JÚNIOR, F.H.; GUEUTIN, C.; CHACUN, H., *et al.*, 2019, “Mucoadhesive paclitaxel-loaded chitosan-poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanocapsules containing copaiba oil designed for oral drug delivery”, **J. D. Deliv. Scie.Technol.**, v. 53, [s.n], pp. 1-9. Available in: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101194>>. Access on: 15 oct. 2020.

YOSHIDA,C.M.P., *et al.*, 2021, “Effect of Chitosan and Aloe Vera Extract Concentrations on the Physicochemical Properties of Chitosan Biofilms”, **Polymers**, v. 13, n. 8, pp.1187. Available in: <https://doi.org/10.3390/polym13081187>. Access on: 08 jul.2022.

APÊNDICES



Article

Chitosan Membrane Containing Copaiba Oil (*Copaifera* spp.) for Skin Wound Treatment

Sheila Barbosa Paranhos ¹, Elisângela da Silva Ferreira ¹, Caio Augusto de Almeida Canelas ², Simone Patrícia Aranha da Paz ¹, Marcele Fonseca Passos ³, Carlos Emmerson Ferreira da Costa ⁴, Alisson Clay Rios da Silva ³, Sergio Neves Monteiro ⁵ and Verônica Scarpini Candido ^{1,*}

- ¹ Engineering of Natural Resources of the Amazon Program, Federal University of Pará—UFPA, Rua Augusto Correa 01, Belem 66075-110, Brazil; paranhos@ufpa.br (S.B.P.); licalipe8@yahoo.com.br (E.d.S.F.); paz@ufpa.br (S.P.A.d.P.)
 - ² Amazon Oil Laboratory, Faculty of Biotechnology, Federal University of Pará—UFPA, Rua Augusto Correa 01, Belem 66075-110, Brazil; caio.a.canelas@gmail.com
 - ³ Materials Science and Engineering Program, Federal University of Pará—UFPA, Tv We 26, Ananindeua 67130-660, Brazil; cellepassos@gmail.com (M.F.P.); alissonrios@ufpa.br (A.C.R.d.S.)
 - ⁴ Chemical Program, Federal University of Pará—UFPA, Rua Augusto Correa 01, Belem 66075-110, Brazil; emmerson@ufpa.br
 - ⁵ Department of Materials Science, Military Institute of Engineering—IME, Praça General Tiburcio 80, Urca, Rio de Janeiro 22290-270, Brazil; snevesmonteiro@gmail.com
- * Correspondence: scarpini@ufpa.br; Tel.: +91-991917375

Abstract: The interaction of copaiba oil in the polymer matrix of chitosan can produce a favorable synergistic effect and potentiate properties. Indeed, the bioactive principles present in copaiba oil have anti-inflammatory and healing action. In the present work, chitosan membranes containing different contents of copaiba oil (0.1, 0.5, 1.0 and 5.0% (v/v)) were for the first time investigated. The membranes were developed by the casting method and analyzed for their morphology, degree of intumescence, moisture content, contact angle, Scanning Electron Microscope, and X-ray diffractometry. These chitosan/copaiba oil porous membranes disclosed fluid absorption capacity, hydrophilic surface, and moisture. In addition, the results showed that chitosan membranes with the addition of 1.0% (v/v) of copaiba oil presented oil drops with larger diameters, around 123.78 μm . The highest fluid absorption indexes were observed in chitosan membranes containing 0.1 and 0.5% (v/v) of copaiba oil. In addition, the copaiba oil modified the crystalline structure of chitosan. Such characteristics are expected to favor wound treatment. However, biological studies are necessary for the safe use of chitosan/copaiba oil membrane as a biomaterial.

Keywords: polymers; chitosan; copaiba oil; wound healing



Citation: Paranhos, S.B.; Ferreira, E.d.S.; Canelas, C.A.d.A.; da Paz, S.P.A.; Passos, M.F.; da Costa, C.E.F.; da Silva, A.C.R.; Monteiro, S.N.; Candido, V.S. Chitosan Membrane Containing Copaiba Oil (*Copaifera* spp.) for Skin Wound Treatment. *Polymers* **2022**, *14*, 35. <https://doi.org/10.3390/polym14010035>

Academic Editors: Shubham Sharma, Jujhar Singh, Rushdan Ahmad Ilyas, Mavinkere Rangappa Sanjay and Changhe Li

Received: 9 November 2021

Accepted: 28 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Innovative dressings have been targeted by researchers to assist in the regeneration of damaged tissues. For efficient wound healing, it is necessary that the dressing is non-allergenic, non-toxic, maintains moisture, allows gas exchanges, protects the wound against pathogenic microorganisms, and absorbs exudates from the wound. Moreover, it must stimulate growth factors, promote tissue granulation and reepithelization, and be easy to remove [1,2]. In addition to these attributes, researchers are currently searching for dressing covers that interact with the wound and release natural bioactive molecules that provide elements necessary for wound healing [3].

Biopolymers materials, for example, are commonly used in the medical field as dressings, wound treatment, drug delivery, tissue engineering, and medical implants [4,5]. Chitosan is a natural cationic biopolymer [6] and has been considered in various biomedical applications, including wound healing, because of its many biological and physical-chemical

attributes suitable for application in dressings [7,8]. Chitosan's numerous essential advantages are related to its interaction with the tissue, causing no or low toxicity to degradation, as well as having anti-inflammatory and antibacterial effects [9–11]. In addition, chitosan acts actively as a hemostatic agent and supports tissue regeneration, and is therefore beneficial in wound healing [12,13].

Chitosan is composed of units of poly-(beta-1-4) N-acetyl-D-glucosamine, extracted through partial deacetylation of chitin, one of the most abundant renewable biopolymers, which is obtained at low cost and on a large scale through marine sources [14]. The chemical modifications of chitosan are associated with a tendency for changes caused by the hydroxyl and amine functional groups present in its structure [15]. However, the efficacy of its properties depends strictly on molecular weight, degree of deacetylation, polydispersibility, and its structure [16]. Therefore, chitosan can be easily processed into a variety of forms to treat skin lesions. Some of these forms, such as membranes, gels and hydrogels, nanoparticles, and scaffolds, can be effective in drug delivery with controlled release of active elements with antimicrobial actions, avoiding infections and accelerating healing [17].

Several chitosan membranes are formulated in combination with natural and synthetic base materials for wound treatment. Tamer et al. [18] formulated a chitosan-based membrane with sodium hyaluronate and used glutathione with antioxidant action to accelerate wound healing. In studies by Kenawy et al. [19], the chitosan/gelatin/cinnamaldehyde combined dressing produced membranes with effective antibacterial properties that could be used on wounds. Xie et al. [20] created a membrane composed of chitosan, collagen, and alginate with promising effects on tissue repair. A study conducted by Susanto et al. [21] concluded that the chitosan membrane associated with collagen induced an increase in the number of fibroblasts in the mandibular defect of rats.

Medicinal alternative therapies for treating wounds with bioactive compounds have gained importance in recent years [22]. Combining chitosan with copaiba oil can be an attractive compound to minimize wound healing difficulties, and prevent infections.

Copaiba oleoresin is an abundant natural resource in the Brazilian Amazon, used for centuries by traditional peoples for therapeutic purposes, mainly anti-inflammatory and wound healing [23–25]. The medicinal property of copaiba oil was attributed to β -caryophyllene, one of the most important constituents of the oil. Several studies have reported β -caryophyllene as possibly responsible for the anti-inflammatory action [26,27]. Moreover, other pharmacological properties have been attributed to the oil, such as analgesic, antinociceptive, antitumor, antioxidant, and antimicrobial activities [28–30]. The antibacterial effect was potentially observed against the pathogen *Staphylococcus aureus* by combining chitosan/gelatin/copaiba oil in the form of an emulsion [31].

Biopolymers' properties can be enhanced or improved with the incorporation of copaiba oil. Norcino et al. [32] concluded that pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions improved physical-mechanical and antimicrobial properties. Experiments by Pascoal et al. [33] resulted in developing topical dressings with copaiba oil conjugated with commercial biopolymers as an option for the controlled release of cutaneous anti-leishmaniasis drugs. Hydrogel formulation based on polymers containing copaiba oil nanoemulsions reduced the inflammatory factors caused by ear and paw edema in mice [34]. Nanocapsules containing copaiba oil and chitosan may increase synergism with anti-cancer drugs [35]. Chitosan-based membranes have been widely explored, especially as wound dressings [36–41]. However, there are gaps involving wound healing and appropriate materials according to the type of wounds. Studies exploring polymer synergism with copaiba oil are necessary due to incipience in the literature. Recently, Debone et al. [41] researched different concentrations of chitosan-copaiba oil films for wound dressing application, but in this work, the authors did not investigate the combination of various copaiba oil concentrations (0.1, 0.5, 1.0, and 5.0% v/v) in chitosan solution (1.0% v/v). Furthermore, [41] did not research the contact angle, moisture content, and X-ray diffraction of films. Moreover, [41] did not perform statistical analysis to validate the

results. In the present work, a detailed statistical analysis of the results of contact angle and moisture content was done, and the interaction of chitosan and copaiba oil was for the first time studied in different concentrations as an approach to develop a membrane that could be beneficial as an active dressing for skin wounds. In this context, the objective of this study is to analyze the influence of copaiba oil on the chitosan membrane as a possible application in the treatment of skin wounds.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Commercial chitosan (CAS: 9012–76–4) (medium molecular weight-190,000–310,000 Da and deacetylation degree in the range 75–85%) was obtained from Sigma Aldrich Laboratory (São Paulo, Brazil). Glacial acetic acid (Scientific Exodus), sodium hydroxide P.A. (Vetec) reagents, and distilled water (conductivity 1.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Phosphate buffered saline solution (PBS) with pH = 7.2. The copaiba resin oil was obtained from Amazon Oil (Belém, Brazil). Its technical characteristics are listed in Table 1.

Table 1. Technical specifications of commercially purchased copaiba oil.

Characteristics	Units	Presentation
Appearance (25 °C)	----	Liquid, with low viscosity
Color	----	Yellowish, greenish to brown
Aroma	----	Typical wooden
Density	g/mL	0.912
Refraction index (20 °C)	----	1.5
Solubility in water	----	Insoluble

2.2. Membrane Production by Casting Method

The emulsions for membrane production were prepared following the method described by [41] with modifications. For the production of chitosan suspension, the polysaccharide (1.0% v/v) was dissolved in an aqueous solution of acetic acid (1% v/v). To verify the effective formation of the emulsion, solutions were kept at rest for 7 days, and then a visual analysis was carried out in order to verify the non-separation of the phases.

The membranes were obtained by the casting method (see Figure 1) according to the methodology proposed by [41] with modification. Chitosan was dissolved in an aqueous solution of acetic acid in magnetic agitation for 24 h. Copaiba oil was added to the chitosan solution in magnetic agitation for another 3 h. Four concentrations of copaiba oil (0.1%, 0.5%, 1.0%, and 5% v/v) were analyzed in chitosan solution. After stirring, the mixture (chitosan/oil solution) was spilled into a polystyrene Petri dish with a volume of 50 mL. The solutions were subjected to a drying process for 24 h on a stove at 40 °C for both acid evaporation and membrane formation. Dry membranes were neutralized with 5% sodium hydroxide (v/v) for 2 h. After this period, the membranes were washed with plenty of distilled water to remove the excess from the reagent and then placed for drying at room temperature (RT) for 24 h. The chitosan membrane without copaiba oil was produced as a control sample and subjected to the same processing conditions.

2.3. Characterization of Membranes

2.3.1. Macroscopic Analysis

The chitosan membranes prepared with and without copaiba oil were subjected to visual and tactile inspection to evaluate color, continuity, homogeneity, and maneuverability.

2.3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The surface of the membranes was observed using a scanning electron microscope (Tescan-Vega 3, Brno, Czech Republic) equipped with a 5 kV field emission electron source. Initially, the membranes cryogenic cut on liquid nitrogen then mounted on a metal smear and coated with a thin layer of gold–palladium. The particle diameter was measured using the Vega 3 software, model Vega 3 (Tescan, version 3, Czech Republic).

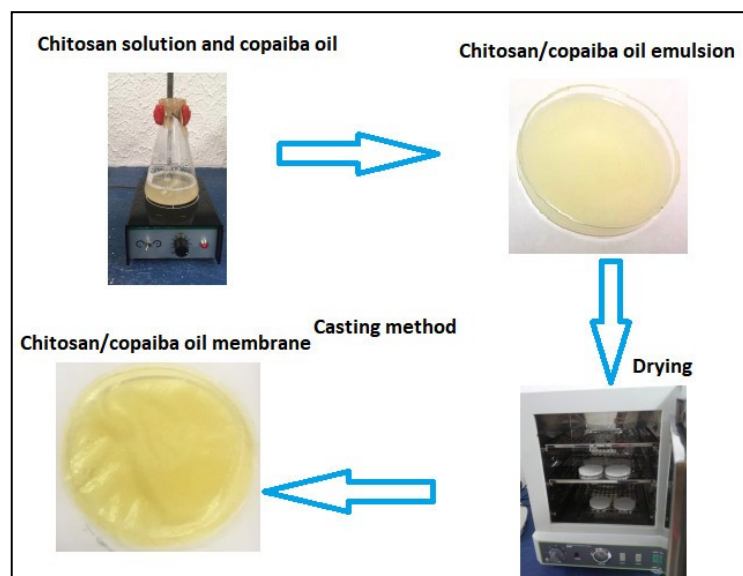


Figure 1. Schematic diagram of the synthesis of chitosan membranes/copaiba oil by the casting method.

2.3.3. Absorption Capacity/Degree of Intumescence

Tests for the absorption capacity or degree of intumescence of Ch-control membranes ChCo-0.1, ChCo-0.5, ChCo-1.0, ChCo-5.0 samples with a 1 cm diameter were performed in phosphate-saline buffer solution (pH = 7.4) and in distilled water at RT in triplicate to evaluate the initial behavior of intumescence in the first hour and after 24 h, 7 days, and 14 days, which corresponds to the time of the future biocompatibility study. The samples were initially weighed on a digital analytical scale (ChyoBrand, jk 200 model, Tokio, Japan) and then immersed in fluids. After each period of analysis, the tumid membranes were removed from the medium, and the excess liquid was removed from the surface using filter paper. The absorption capacity was determined by means of the difference of the tumid samples in relation to the dried samples according to:

$$\text{Absorption (\%)} = ((M_f - M_i) / M_i) \times 100 \quad (1)$$

where: M_f = final mass of the tumid sample; M_i = dry initial sample mass.

2.3.4. Moisture Determination

The moisture content of the membranes was evaluated by the gravimetric method. For this, the initial mass of the samples of the three membranes was weighed on the above-mentioned analytical scale. Then, the samples were dried in an analogical stove (Sterilifer-modelSX1.2, São Paulo, Brazil) at ± 105 °C for 24 h. After this procedure, they were again weighed. The humidity contained in the samples was determined according to:

$$U (\%) = ((M_i - M_f) / M_i) \times 100 \quad (2)$$

where: U = percentage of humidity; M_i = initial mass; M_f = final mass.

2.3.5. Contact Angle Measurement

The contact angle of the droplet with the membrane was determined on each sample using the sessile drop method. A drop (0.05 mL) of distilled water was placed on the membrane at RT for 30 s. Images were captured with a camera and analyzed by the ImageJ software (National Institute Health, version 1.51n) to measure the angle formed between the membrane contact and water drop.

2.3.6. X-ray Diffractometry (XRD) Analysis

XRD analyses were performed on the Empyrean Model X-Ray diffractometer (DXR) (Malvern, United Kingdom) of PANalytical using Co anode ceramic X-ray tubes ($K\alpha_1 = 1.789010 \text{ \AA}$). Phase identification was performed using the X-Pert HighScore Plus (Panalytical) software (Malvern Panalytical, version 5.1).

2.3.7. Statistical Analysis






The statistical validation of the data was performed using the analysis of variance test (ANOVA), with a confidence interval of 95% ($p < 0.05$). The mean values were compared by the Tukey test.

3. Results and Discussion

3.1. Macroscopic Analysis of Membranes

Table 2 shows the macroscopic aspects of the membranes.

Table 2. Macroscopic characteristics of membranes.

Description		Color	Homogeneity	Continuity	Handling
Ch-control		Slightly yellowish	Loud	Loud	Loud
ChCo-0.1		Slightly yellowish	Intermediate	Loud	Loud
ChCo-0.5		Slightly yellowish	Intermediate	Loud	Loud
ChCo-1.0		More intense yellow+	Intermediate	Loud	Loud
ChCo-5.0		More intense yellow++	Low	Low	Low

All chitosan solutions produced thin, yellowish membranes. The pure chitosan membrane (without oil) exhibited a slightly yellow color and relative transparency. The yellow color was more intense in the membranes prepared with copaiba oil. Such aspects of the color of the membranes are related to both the color of chitosan and the direct influence of the natural color of the oil. Thus, the yellowish color of the membranes is directly proportional to the concentration of copaiba oil in the chitosan matrix. Moreover, the chitosan membranes with higher copaiba oil contents not only modified the color of the polymer but left them less transparent. However, at lower levels of copaiba oil, the color and transparency seemed similar. Similar effects were observed for chitosan films containing two concentrations of copaiba oil (1% and 2% *v/v*), in which a significant color difference for films more than 2% chitosan were formed for higher oil concentration [41]. The electrostatic interaction between the protonated amino groups of chitosan and the molecules of copaiba oil might have induced this significant change in color with the increase in oil concentration [42].

Based on these results, it can be confirmed that Ch-control and membranes prepared with 0.1%, 0.5% and 1% copaiba oil presented better macroscopic characteristics such as good solubility, no fractures or ruptures, and easy handling. However, the chitosan membrane with 5% copaiba oil (ChCo-5.0) seems to be less appropriate, as it presented fragility during the detachment of the petri dish and caused the separation of phases. This separation seen macroscopically on the membrane surface suggests that the polymer did not completely incorporate the oil into its structure, apparently because it is the membrane with the highest amount of copaiba oil.

3.2. SEM

Figure 2 shows the microstructure of the surfaces of Ch-control and chitosan membranes with copaiba oil (ChCo-0.1; ChCo-0.5; ChCo-1, and ChCo-5.0), and Table 3 describes the size of pore diameters.

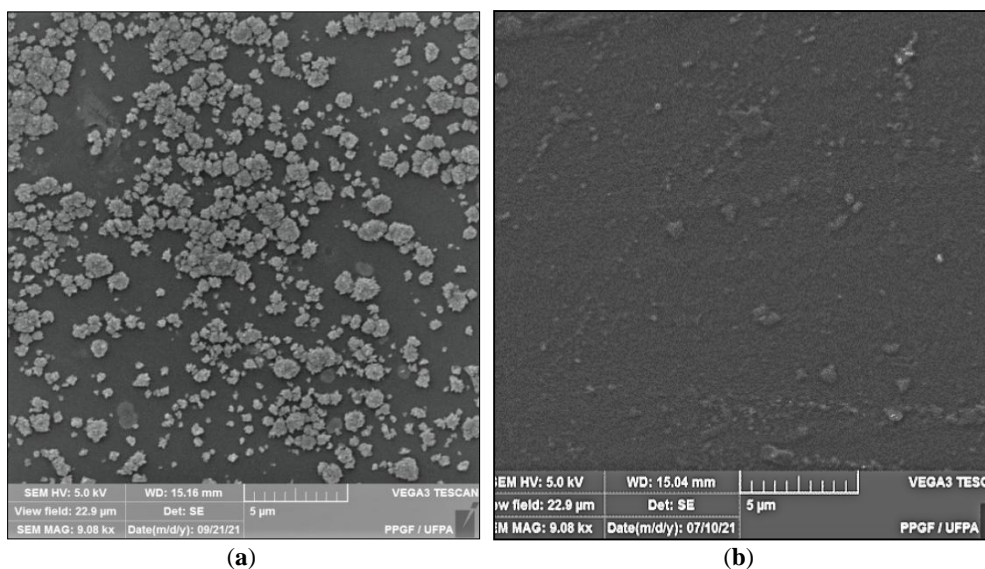
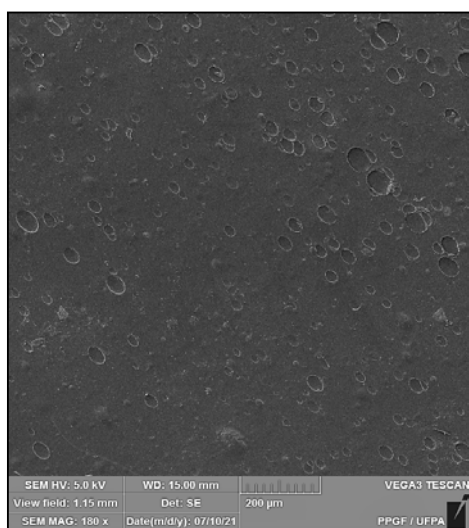
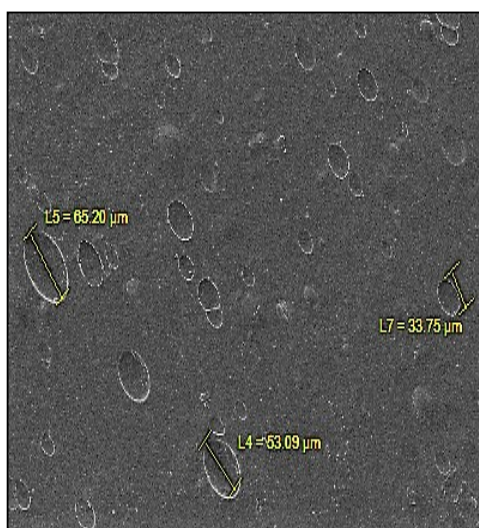


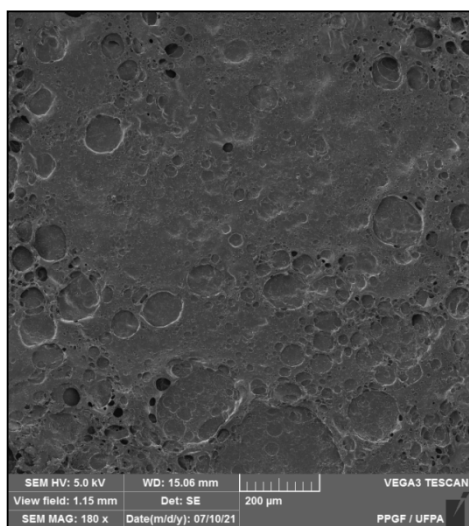
Figure 2. Cont.



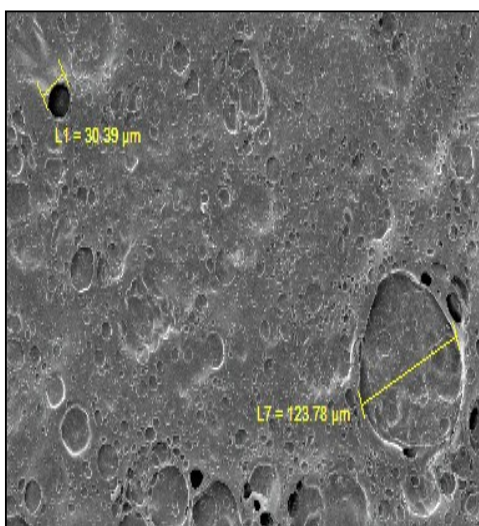
(c)



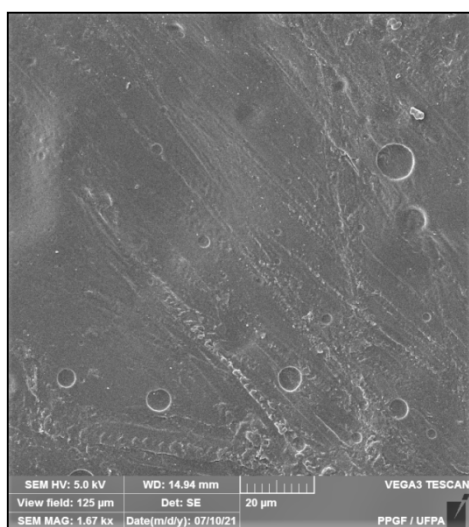
(d)



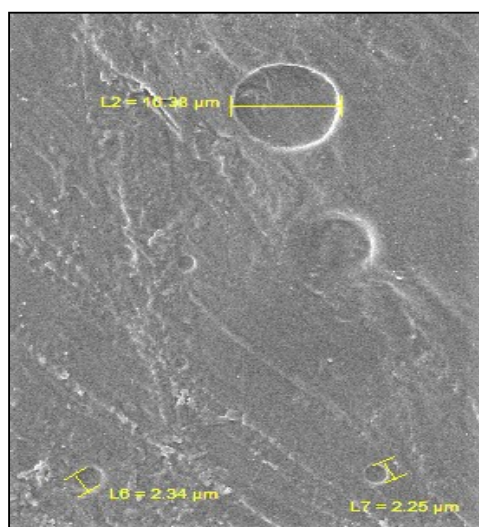
(e)



(f)



(g)



(h)

Figure 2. Cont.

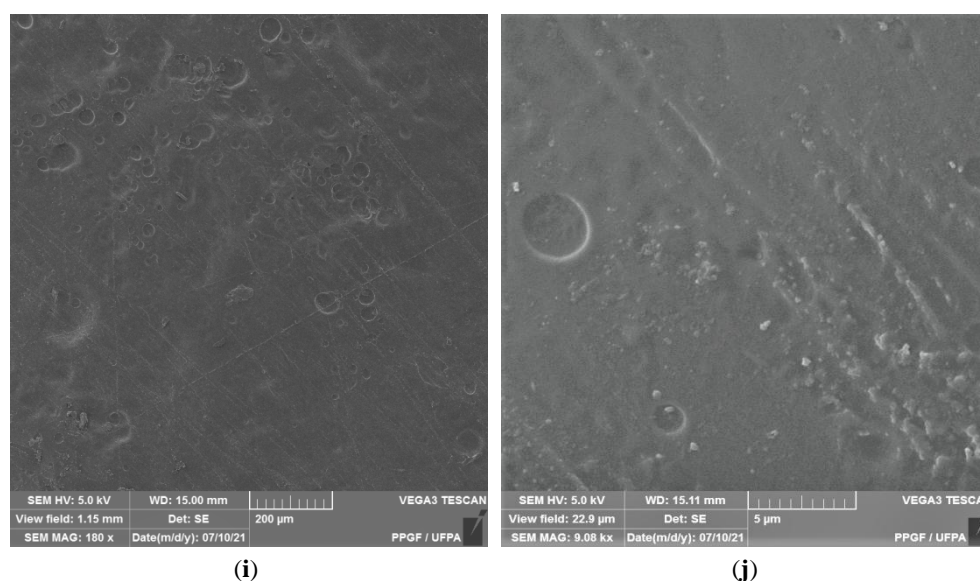


Figure 2. Membrane micrographs: (a) oil-free chitosan (Ch-control)180 magnification; (b) Oil-free chitosan (Ch-control) magnification of 9.08; (c) chitosan with 0.1% copaiba oil (ChCo-0.1) 180 magnification; (d) chitosan with 0.1% copaiba oil (ChCo-0.1) magnification of 9.08; (e) chitosan with 0.5% copaiba oil (ChCo-0.5) magnification of 180, (f) chitosan with 0.5% copaiba oil (ChCo-0.5) magnification of 9.08; (g) chitosan with 1.0% copaiba oil (ChCo-1)magnification of 180; (h) chitosan with 1.0% copaiba oil (ChCo-1)magnification of 180; (i) chitosan with 5.0% copaiba oil (ChCo-5) magnification of 180; (j) chitosan with 5.0% copaiba oil (ChCo-5) magnification of 9.08.

Table 3. Size of membrane pores.

Descriptio n	>Diameter (μm)	<Diameter (μm)
Ch-control	-	-
ChCo-0.1	-	-
ChCo-0.5	65.20	33.75
ChCo-1.0	123.78	30.39
ChCo-5.0	10.38	2.25

In Figure 2c–j, the membrane matrices with copaiba oil were irregular, discontinuous, and with oil droplets, unlike the control matrix (Ch-control) that presented a rough surface. The membrane matrix (ChCo-0.1) shows a structure without the formation of appreciable oil droplets with a dense surface. On the other hand, in the membranes with 0.5%, 1%, and 5% of copaiba oil, dispersed oil drops were observed in their microstructures. However, the number of droplets was more evident in the membrane matrix (ChCo-0.5), whose droplet diameter ranged from 65.20 μm to 33.75 μm . Nevertheless, when the oil concentration was increased to 1% (ChCo-1.0), the size of the drops gained greater effects on the chitosan matrix, with diameters between 123.78 μm and 30.39 μm . In addition, it produced a cluster of drops in the chitosan matrix, promoting interconnection between the drops. This behavior can be explained due to the presence of hydroxyl groups and primary amines that provide the molecule a polar character, so there is repulsion to copaiba oil molecules and, consequently, less miscibility [43,44]. Conversely, the matrix (ChCo-5.0) revealed a structure with a smaller droplet size, which ranged from 10.38 μm to 2.25 μm . Although more pronounced, irregular characteristics were observed, which may indicate fragmentation in the microstructure.

Silva et al. [45] observed that the addition of andiroba oil decreases the number and

size of pores, as the concentration of oil in poly-based polymeric film (ϵ -caprolactone) (PCL), as well as no oil retention on the surface of the films, which may indicate a good interaction of the compound PCL/andiroba. However, the changes that occurred in the

structure of chitosan with the incorporation of oils depending on the molecular structure of the polymer and its chemical interactions. Interaction with natural oils is more favorable if there is an oil emulsification system. This might be achieved using surfactants to improve the permeability, bioavailability, and release characteristics of the active components of the oil [46]. Therefore, it is believed that there was a greater repulsion of the molecules of copaiba oil with chitosan due to the hydrophobic nature of the oil.

3.3. Absorption Capacity/Degree of Intumescences

Figure 3 shows the degree of intumescences as a function of time for chitosan membranes without copaiba oil, and chitosan membranes with copaiba oil, after immersion in water and phosphate-saline buffer solution (PBS).

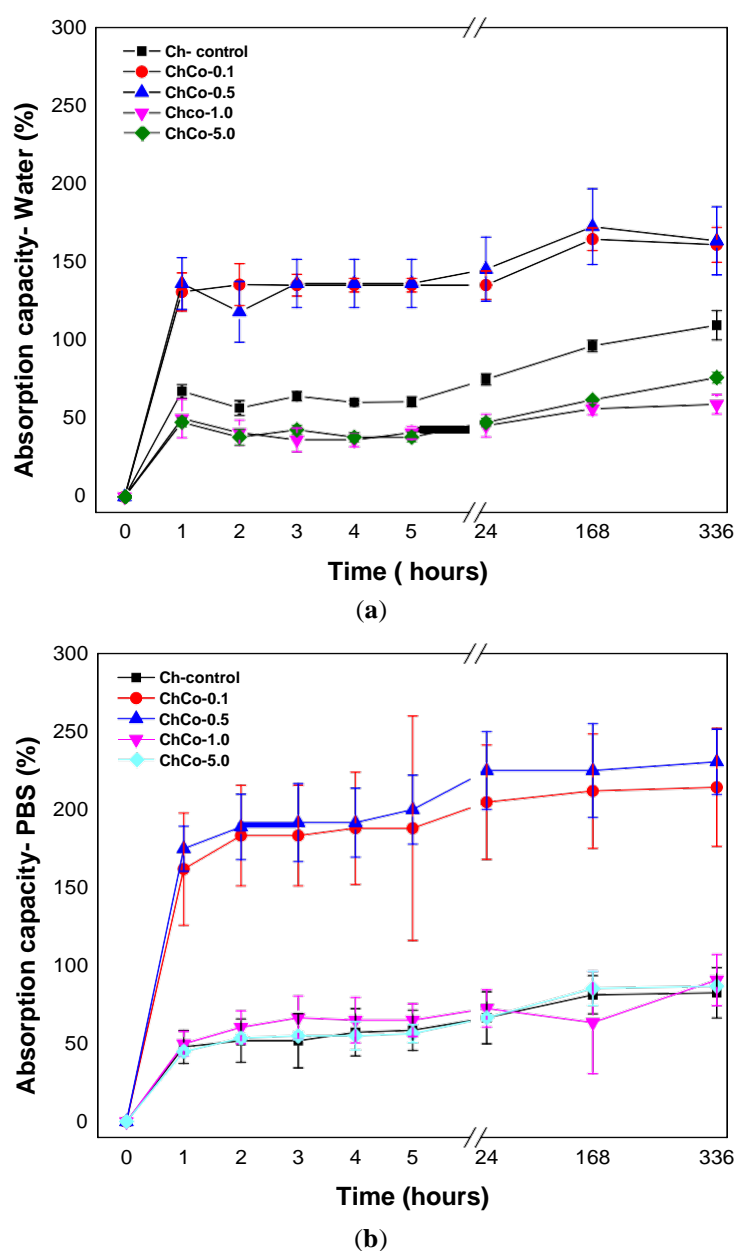


Figure 3. (a) Degree of absorption of membranes in aqueous medium as a function of time; (b) Degree of absorption of membranes in phosphate-saline buffer solution (PBS) as a function of time.

Absorbent materials are ideal for wound healing as they provide controlled moisture, avoiding infection and maceration in the wound bed. The present results showed that the membranes were able to promote fluid absorption. The high absorption rate of membranes containing copaiba oil at concentrations of 0.1% and 0.5% was evident (ChCo-0.1; ChCo-0.5). They revealed higher absorption rates in the presence of PBS solution, whose values obtained in 14 days were 214% and 230%, while in water, they reached 161% and 163%, respectively. However, high concentrations of copaiba oil in the polymer matrix (ChCo-1.0 and ChCo-5.0) showed low absorption rates, especially when in contact with water with values of 56% and 61%, and PBS solution, 90%, and 86%, respectively. However, the oil-free chitosan membrane (Ch-control) interacted better with water, obtaining enhanced absorption capacity in this medium, with a value of 109% and 82% in PBS solution in the period of 14 days. The reason for this divergence of absorption between the solutions stems from the polarity difference between water and the buffer solution. Chitosan has a strong affinity for polar molecules due to its amine and hydroxyl groups, so it has better interaction with water because it is extremely polar (pH = 5.6) when compared to the buffer solution (pH = 7.2) [42]. However, copaiba oil seems to influence the absorption behavior of the chitosan membrane when immersed in water by reducing absorption in this medium. The data also suggest that the effect of porosity may have favored the absorption capacity of membranes with low concentrations of copaiba oil in the chitosan matrix. However, as the oil concentration increases, this phenomenon is reversed due to some kind of interaction or repulsion to the oil.

Gunes and Tihminhoglu [47] concluded in their studies that the increased intumescence in the film containing *H. perforatum* oil could be explained by the formation of a porous structure with the addition of oil in the chitosan matrix. This finding corroborates the results of the present study, as evidenced by the microstructural data obtained by SEM. The analysis of variance, ANOVA, with $p < 0.05$ shown in Table 4, indicates a statistically significant difference in permeability between the groups of chitosan treated without copaiba oil and with copaiba oil when immersed in water and solution in PBS.

Table 4. Results of variance analysis (ANOVA), performed to evaluate the absorption capacity of membranes with copaiba oil content on the chitosan matrix in water and PBS solution.

Origin of Variation	Sum of Squares of	Degrees Freedom (DF)	Middle Square	Value of F	p-Value
Between groups	493,634	9	54,848.20	30.2	<0.05
Within two groups	364,143	200	1820.71	-	-
Total	857,777	209	0.00001		

In Figure 4, the Tukey test suggests a statistically significant difference between chitosan membranes prepared with 0.1% and 0.5% (✓/✓) of copaiba oil, in which greater absorption capacity was observed in the solution in PBS in relation to water. This result is favorable for materials in contact with wounds, considering that the PBS solution simulates the composition of human body fluids. There was no statistically significant difference between oil-free membranes and membranes with 1.0% and 5.0% (✓/✓) of copaiba oil.

In the case of dressing materials, the results may indicate that the membranes compositions ChCo-1.0 and ChCo-5.0 might be more favorable in wounds with little exudates. For example, in cases of dry wounds, this material could be used previously hydrated to dampen the site and stimulate the closure of the lesion. On the other hand, the ChCo-0.1 and ChCo-0.5 membranes may be suitable for highly exudative wounds to control local moisture and thus avoid worsening the injury due to macerated tissue caused by exudates accumulation, thus requiring frequent removal of this material in wounds.

According to the study by Bras et al. [8], a decrease in the volumetric capacity of intumescences with the incorporation of *Cynara cardunculus* extract was observed. This was attributed to the hydrophobic character of the extract and by the presence of lipid fraction

in the composition, which may be appropriate for dressings where excessive sorption of fluids is not desired.

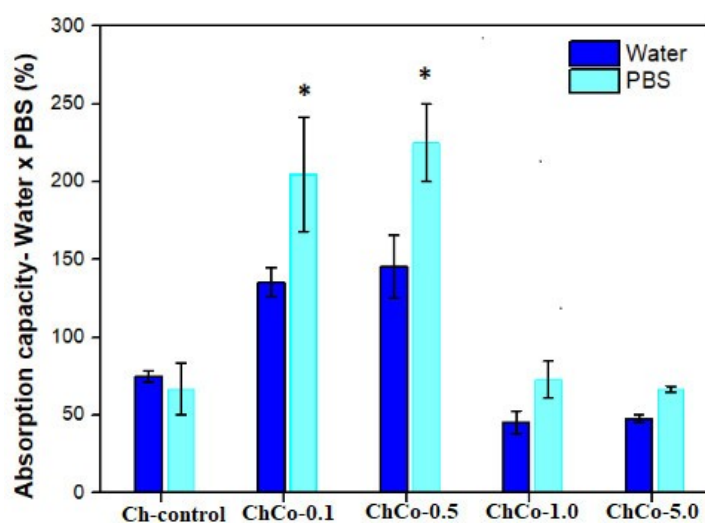


Figure 4. Evaluation of the absorption capacity of fluids of polymeric membranes of Ch-control without chitosan, and incorporated with copaiba oil (ChCo-0.1; ChCo-0.5, ChCo-1.0, ChCo-5.0) immersed for 24 h in water and PBS. The asterisk indicates the statistical difference between the control group and the group with oil obtained in the Tukey test.

3.4. Contact Angle and Moisture Content Determination

Table 5 shows the measurements of the contact angle with water and moisture content for oil-free chitosan membranes and membranes with copaiba oil, aiming to investigate the surface permeability of membranes.

Table 5. Measurements of the contact angle with water and moisture content of the developed membranes.

Membranes		Contact Angle (°)	Moisture Content (%)
Control chitosan membrane	Ch-control	66.73 ± 2.56	21.28 ± 1.18
Chitosan membrane with 0.1% copaiba oil	ChCo-0.1	83.63 ± 3.78	18.57 ± 2.45
Chitosan membrane with 0.5% copaiba oil	ChCo-0.5	80.90 ± 5.65	11.39 ± 1.13
Chitosan membrane with 1% copaiba oil	ChCo-1.0	38.33 ± 4.97	9.93 ± 0.25
Chitosan membrane with 5% copaiba oil	ChCo-5.0	65.03 ± 2.77	19.42 ± 1.12

The wettability of the surface of a biomaterial significantly influences the interaction with the tissue that comes into contact, inducing favorable or unfavorable reactions to the organism [48]. Table 5 shows that all developed membranes presented hydrophilic surfaces, although the surface interaction with water occurred in different ways. This result can be explained by the presence of hydroxyl and amino groups present in the structure of chitosan. The positive charges that arise when the amino groups are protonated decrease the surface free energy, improving the wettability of the membranes [32]. Thus, it is assumed that copaiba oil with low contents (ChCo-0.1 and ChCo-0.5) modified the hydrophilic characteristic of membranes, reducing surface hydrophilicity. However, 1.0% oil content enhanced the membrane hydrophilicity. Such behavior can be associated with the equilibrium relationship between the adhesive and cohesive forces of the liquid, suggesting that a change in this balance may have caused a change in the droplet diameter

and, consequently, an increase in hydrophilicity as indicated by [15]. Meanwhile, the hydrophilic condition of the sample with 5% oil (ChCo-5%) approached that of the control membrane. Similar results [32] occurred in the formation of the film containing copaiba oil and pectin, which caused an increase in the contact angle and consequently resulted in a decrease in the hydrophilicity of the polymeric film.

Table 5 presents values of the moisture content of the membranes. The developed membranes disclose different percentages of moisture. However, the oilless chitosan membrane (Ch-control) is shown to be relatively moister between the membranes. This behavior decreased in membranes containing copaiba oil, making them less moist.

ANOVA showed a hydrophilicity effect associated with the surface of chitosan membrane with copaiba oil since it showed a statistically significant difference between oil-free membranes and oil-treated membranes, as shown in Table 6.

Table 6. Results of variance analysis (ANOVA) performed to evaluate the effect of hydrophilicity on the surface of membranes with copaiba oil content on the chitosan matrix.

Origin of Variation	Sum of Squares of	Degrees Freedom (DF)	Middle Square	Value of F	p-Value
Between groups	3886.70	4	971.68	56.93	<0.05
Within two groups	170.69	10	17.07	-	-
Total	4057.39	14	0.00008		

In Figure 5, the Tukey Test confirms that the chitosan membrane with 1.0% copaiba oil was the most hydrophilic sample with the lowest contact angle with a significant statistical difference ($p < 0.05$) between the membranes. In contrast, samples with low copaiba oil content have a less hydrophilic character when compared to the control sample and the sample with 5% (✓✓) of oil.

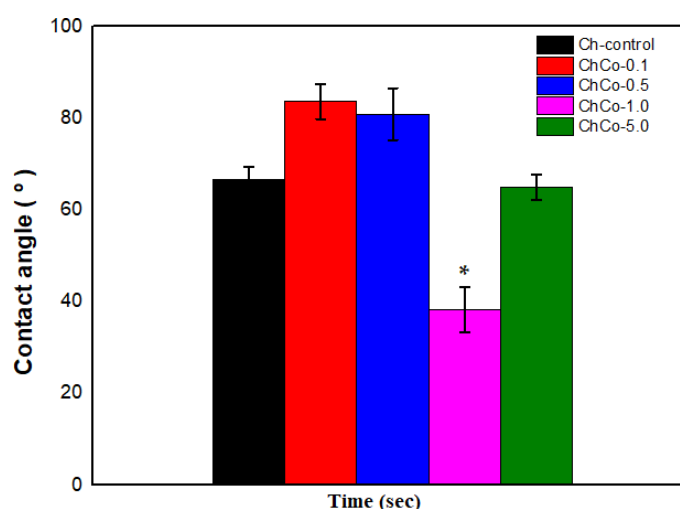


Figure 5. Contact angle of membranes with analysis of the Anova Test ($p < 0.05$; DF = 4) and the Tukey Test. The asterisk indicates the sample with significant statistical difference ($p < 0.05$).

As was observed by the ANOVA, there is a statistical difference between membranes. Indeed, there is an effect on the membrane moisture when copaiba oil is incorporated in the polymer matrix of chitosan, as shown in Table 7.

Table 7. Results of variance analysis (ANOVA) performed to evaluate the effect of moisture of membranes with copaiba oil content on the chitosan matrix.

Origin of Variation	Sum of Squares of	Degrees Freedom (DF)	Middle Square	Value of F	p-Value
Between groups	312.31	4	78.0769	38.78	<0.05
Within two groups	20.13	10	2.01318	-	-
Total	332.44	14	0.00027		

In Figure 6, the Tukey Test showed that chitosan membranes containing 0.5% and 1.0% showed a statistically significant difference between membranes ($p < 0.05$). Thus, the data suggest that the water content was lower in the ChCo-0.5 and ChCo-1.0 membranes. However, chitosan membranes with 0.1% and 5.0% copaiba oil lost little water in their structures compared to the control chitosan membrane (Ch-control).

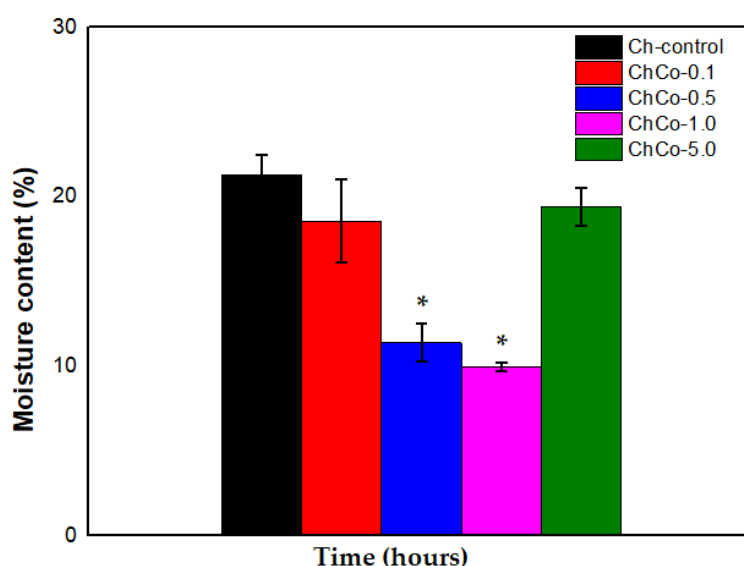


Figure 6. Percentage of membrane moisture with analysis of the ANOVA Test ($p < 0.05$; DF = 4) and the Tukey Test. The asterisk indicates the sample with significant statistical difference ($p < 0.05$).

3.5. X-ray Diffractometry (XRD) Analysis

The diffractogram of the studied membranes is shown in Figure 7. This figure shows that the addition of copaiba oil causes a broadening of the peaks of chitosan without oil, whose diffractogram is characteristic of a semi-crystalline material.

The diffractions of 2 broad peaks in 2θ : 10.55, 23.373, 2θ : 11.55, and 23.70, respectively, were analyzed. Such peaks are typically chitosan. Chitosan arrangements with copaiba oil promote enlargement of the peaks of the polymer matrix, resulting in a decreased crystallinity. In the chitosan sample with 0.1% copaiba oil, only 1 peak was observed at 2θ : 22.96. In samples containing 0.5% and 1.0% copaiba oil, diffraction peaks were not identified, characterizing them as an amorphous structure. There was a discrete peak in 2θ in the sample containing 5.0% copaiba oil in 2θ : 7.92. Similar behavior was observed in the interaction between cyclodextrin and copaiba oil, causing changes in the XRD profile resulting in the formation of inclusion complexes [49]. Tovar et al. [50] observed that the crystalline structure of chitosan was slightly affected by the incorporation of *Rutagraveolens* essential oil.

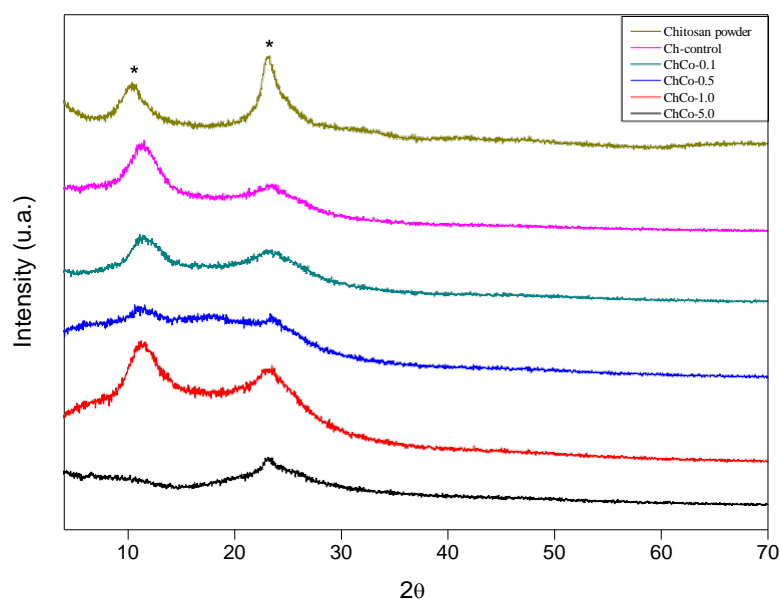


Figure 7. X-ray diffractogram. (*) Chitosan.

4. Conclusions

Polymeric membranes composed of chitosan and copaiba oil were successfully developed by the casting method for application in wound treatment. The incorporation of copaiba oil in the polymer matrix produced membranes. These membranes can be applied to wounds with different exudative characteristics, such as ChCo0.1 and ChCo0.5% indicated for more exudative wounds, and ChCo1.0 and ChCo5.0% for less exudative wounds. The membrane structure presented interfacial matrices with favorable porosity and wettability, which may have improved fluid absorption, strongly dependent on oil concentrations. In addition, copaiba oil produced an interaction with chitosan, altering its crystallinity pattern. These results indicate that the influence of copaiba oil on the chitosan matrix might be favorable in wound healing. However, further studies of the mechanical properties and tests of antimicrobial and cytotoxic activities are necessary to ensure the safety and use efficacy as a biomaterial.

Author Contributions: Conceptualization, S.B.P., A.C.R.d.S. and V.S.C.; Data curation, S.B.P. and V.S.C.; Formal analysis, S.B.P., E.d.S.F., C.A.d.A.C., S.P.A.d.P., M.F.P., C.E.F.d.C., A.C.R.d.S., S.N.M. and V.S.C.; Funding acquisition, S.N.M.; Methodology, S.B.P., E.d.S.F. and M.F.P.; Project administration, V.S.C.; Supervision, A.C.R.d.S. and V.S.C.; Validation, S.B.P., E.d.S.F., C.A.d.A.C., S.P.A.d.P., M.F.P., C.E.F.d.C., A.C.R.d.S., S.N.M. and V.S.C.; Visualization, S.B.P., E.d.S.F., C.A.d.A.C., S.P.A.d.P., M.F.P., C.E.F.d.C., A.C.R.d.S., S.N.M. and V.S.C.; Writing—original draft, S.B.P.; Writing—review & editing, V.S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially financed by Dean of Research and Graduate Studies (Propesp), Federal University of Para, process number 23073.050278/2021-11.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes). Dean of Research and Graduate Studies (Propesp).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- F- El-Hack, M.E.A.; El-Saadony, M.T.; Shafi, M.E.; Zabermaawi, N.M.; Arif, M.; Batiha, G.E.; Khafaga, A.F.; El-Hakim, Y.M.A.; Al-Sagheer, A.A. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 2726–2744. [[CrossRef](#)]
- G- Shi, C.; Wang, C.; Liu, H.; Li, Q.; Li, R.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Shao, Y.; Wang, J. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- H- Dhivya, S.; Padma, V.V.; Santhini, E. Wound dressings—A review. *Biomedicine* **2015**, *5*, 1–5. [[CrossRef](#)]
- I- Gobi, R.; Ravichandiran, P.; Babu, R.; Yoo, D. Biopolymer and Synthetic Polymer-Based Nanocomposites in Wound Dressing Applications: A Review. *Polymers* **2021**, *13*, 1962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- J- Shen, S.; Chen, X.; Shen, Z.; Chen, H. Marine Polysaccharides for Wound Dressings Application: An Overview. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- K- Bezerra, G.S. *Chitosan-Based Copaiba Oil Carrier Polymeric Systems: Obtaining, Characterization and Antifungal Activity In Vitro*, Monography, Federal University of Rio Grande do Norte: Rio Grande do Norte, Brazil, 2020; pp. 1–24.
- L- Yoshida, C.M.P.; Pacheco, M.S.; de Moraes, M.A.; Lopes, P.S.; Severino, P.; Souto, E.B.; da Silva, C.F. Effect of Chitosan and Aloe Vera Extract Concentrations on the Physicochemical Properties of Chitosan Biofilms. *Polymers* **2021**, *13*, 1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- M- Brás, T.; Rosa, D.; Gonçalves, A.C.; Gomes, A.C.; Alves, V.D.; Crespo, J.G.; Duarte, M.F.; Neves, L.A. Development of bioactive films based on chitosan and *Cynara cardunculus* leaves extracts for wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *163*, 1707–1718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- N- Moradi, S.; Hamed, H.; Tonelli, A.E.; King, M.W. Chitosan/Graphene Oxide Composite Films and Their Biomedical and Drug Delivery Applications: A Review. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 7776. [[CrossRef](#)]
- O- Soriente, A.; Fasolino, I.; Gomez-Sánchez, A.; Prokhorov, E.; Buonocore, G.G.; Luna-Barcenas, G.; Ambrosio, L.; Raucci, M.G. Chitosan/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds to modulate osteogenic and inflammatory response. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2021**, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- P- Hassan, M.A.; Tamer, T.M.; Valachová, K.; Omer, A.M.; El-Shafeey, M.; Eldin, M.S.M.; Šoltés, L. Antioxidant and antibacterial polyelectrolyte wound dressing based on chitosan/hyaluronan/phosphatidylcholine dihydroquercetin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *166*, 18–31. [[CrossRef](#)]
- Q- Feng, P.; Luo, Y.; Ke, C.; Qiu, H.; Wang, W.; Zhu, Y.; Hou, R.; Xu, L.; Wu, S. Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 1–15. [[CrossRef](#)]
- R- Vivcharenko, V.; Benko, A.; Palka, K.; Wojcik, M.; Przekora, A. Elastic and biodegradable chitosan/agarose film revealing slightly acidic pH for potential applications in regenerative medicine as artificial skin graft. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 172–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- S- Islam, S.; Bhuiyan, M.A.R.; Islam, M.N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *J. Polym. Environ.* **2017**, *25*, 854–866. [[CrossRef](#)]
- T- Ładniak, A.; Jurak, M.; Wiaćek, A.E. Wettability of DPPC Monolayers Deposited from the Titanium Dioxide–Chitosan–Hyaluronic Acid Subphases on Glass. *Colloids Interfaces* **2019**, *3*, 15. [[CrossRef](#)]
- U- Hamed, H.; Moradi, S.; Hudson, S.M.; Tonelli, A.E. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 445–460. [[CrossRef](#)]
- V- Ribeiro, D.M.L.; Júnior, A.R.C.; de Macedo, G.H.R.V.; Chagas, V.L.; Silva, L.D.S.; Cutrim, B.D.S.; Santos, D.M.; Soares, B.L.L.; Zagnignan, A.; Miranda, R.D.C.M.D.; et al. Polysaccharide-Based Formulations for Healing of Skin-Related Wound Infections: Lessons from Animal Models and Clinical Trials. *Biomolecules* **2019**, *10*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- W- Tamer, T.M.; Hassan, M.A.; Valachová, K.; Omer, A.M.; El-Shafeey, M.E.; Eldin, M.S.M.; Šoltés, L. Enhancement of wound healing by chitosan/hyaluronan polyelectrolyte membrane loaded with glutathione: In vitro and in vivo evaluations. *J. Biotechnol.* **2020**, *310*, 103–113. [[CrossRef](#)]
- X- Kenawy, E.; Omer, A.M.; Tamer, T.M.; Elmeligy, M.A.; Eldin, M.S.M. Fabrication of biodegradable gelatin/chitosan/cinnamaldehyde crosslinked membranes for antibacterial wound dressing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 440–448. [[CrossRef](#)]
- Y- Xie, H.; Chen, X.; Shen, X.; He, Y.; Chen, W.; Luo, Q.; Ge, W.; Yuan, W.; Tang, X.; Hou, D.; et al. Preparation of chitosan-

- collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 93–104. [[CrossRef](#)]
- Z- Susanto, A.; Susanah, S.; Priosoeryanto, B.P.; Satari, M.H.; Komara, I. The effect of the chitosan-collagen membrane on wound healing process in rat mandibular defect. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2019**, *23*, 113–118. [[CrossRef](#)]
- AA- Winkelman, W.J. Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. *Clin. Dermatol.* **2018**, *36*, 299–305. [[CrossRef](#)]
- BB- Tobouti, P.L.; Martins, T.C.D.A.; Pereira, T.J.; Mussi, M.C.M. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 93–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- CC- Teixeira, F.B.; Silva, R.D.B.; Lameira, O.A.; Webber, L.P.; Couto, R.S.D.; Martins, M.D.; Lima, R.R. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 313. [[CrossRef](#)]

- DD- Alvarenga, M.O.P.; Bittencourt, L.O.; Mendes, P.F.S.; Ribeiro, J.T.; Lameira, O.A.; Monteiro, M.C.; Barboza, C.A.G.; Martins, M.D.; Lima, R.R. Safety and Effectiveness of Copaiba Oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on Inflammation and Tissue Repair of Oral Wounds in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3568. [CrossRef]
- EE- Sibin, A.P.A.; Barizão, C.L.; Castro-Ghizoni, C.V.; Silva, F.M.S.; Sá-Nakanishi, A.B.; Bracht, L.; Bersani-Amado, C.A.; Marçal-Natali, M.R.; Bracht, A.; Comar, J.F. β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 10262–10277. [CrossRef]
- FF- Pascoal, D.R.C.; Velozo, E.S.; Braga, M.E.M.; de Sousa, H.C.; Cabral-Albuquerque, E.C.M.; De Melo, S.A.B.V. Bioactive compounds of *Copaifera* sp. impregnated into three-dimensional gelatin dressings. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 1537–1551. [CrossRef]
- GG- Ghizoni, C.V.C.; Ames, A.P.A.; Lameira, O.A.; Amado, C.A.B.; Nakanishi, A.B.S.; Bracht, L.; Natali, M.R.M.; Peralta, R.M.; Bracht, A.; Comar, J.F. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 3409–3423. [CrossRef] [PubMed]
- HH- Becker, G.; Brusco, I.; Casoti, R.; Marchiori, M.C.L.; Cruz, L.; Trevisan, G.; Oliveira, S.M. Copaiba oleoresin has topical antinociceptive activity in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *250*, 112476. [CrossRef] [PubMed]
- II- Dias, F.G.G.; Pereira, L.F.; Furtado, R.A.; Magalhães, G.M.; Miguel, M.P.; Dias, L.G.G.G.; Jorge, A.T.; Honsho, C.S.; Ambrósio, S.R.; Bastos, J.K.; et al. Topical formulations containing *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin improve cutaneous wound healing. *Avicenna J. Phytomed.* **2021**, *11*, 120–133. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8051314/pdf/AJP-11-120.pdf> (accessed on 29 October 2021).
- JJ- Marangon, C.; Martins, V.; Leite, P.M.; Santos, D.; Nitschke, M.; Plepis, A. Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *99*, 163–171. [CrossRef]
- KK- Norcino, L.; Mendes, J.; Natarelli, C.; Manrich, A.; Oliveira, J.; Mattoso, L. Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for potential use as bio-based active packaging. *Food Hydrocoll.* **2020**, *106*, 105862. [CrossRef]
- LL- Pascoal, D.; Cabral-Albuquerque, E.; Velozo, E.; de Sousa, H.; de Melo, S.V.; Braga, M. Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: A potential alternative topical antileishmanial treatment. *J. Supercrit. Fluids* **2017**, *129*, 106–115. [CrossRef]
- MM- Lucca, L.G.; De Matos, S.P.; Kreutz, T.; Teixeira, H.F.; Veiga, V.F.; De Araújo, B.V.; Limberger, R.P.; Koester, L.S. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *AAPS PharmSciTech* **2017**, *19*, 522–530. [CrossRef]
- NN- Xavier-Jr, F.; Gueutin, C.; Chacun, H.; Vauthier, C.; Egito, E. Mucoadhesive paclitaxel-loaded chitosan-poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanocapsules containing copaiba oil designed for oral drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 1–9. [CrossRef]
- OO- Cunha, C.S.; Castro, P.J.; Sousa, S.; Pullar, R.; Tobaldi, D.M.; Piccirillo, C.; Pintado, M.M. Films of chitosan and natural modified hydroxyapatite as effective UV-protecting, biocompatible and antibacterial wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *159*, 1177–1185. [CrossRef]
- PP- Escárcega-Galaz, A.A.; Sánchez-Machado, D.I.; López-Cervantes, J.; Sanches-Silva, A.; Madera-Santana, T.J.; Paseiro-Losada, P. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *116*, 472–481. [CrossRef]
- QQ- Yassue-Cordeiro, P.H.; Zandonai, C.H.; Genesi, P.B.; Lopes, P.S.; Sanchez-Lopez, E.; Garcia, M.L.; Fernandes-Machado, N.R.C.; Severino, P.; Souto, E.B.; Da Silva, C.F. Development of Chitosan/Silver Sulfadiazine/Zeolite Composite Films for Wound Dressing. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 1–23. [CrossRef]
- RR- Eulálio, H.Y.C.; Vieira, M.; Fideles, T.B.; Tomás, H.; Silva, S.M.L.; Peniche, C.A.; Fook, M.V.L. Physicochemical Properties and Cell Viability of Shrimp Chitosan Films as Affected by Film Casting Solvents. I-Potential Use as Wound Dressing. *Materials* **2020**, *13*, 5005. [CrossRef]
- SS- Akhavan-Kharazian, N.; Izadi-Vasafi, H. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/nanocrystalline cellulose/calcium peroxide films for potential wound dressing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *133*, 881–891. [CrossRef] [PubMed]
- TT- Debone, H.S.; Lopes, P.S.; Severino, P.; Yoshida, C.M.P.; Souto, E.B.; da Silva, C.F. Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application. *Int. J. Pharm.* **2019**, *555*, 146–152. [CrossRef] [PubMed]
- UU- Gozdecka, A.; Wia, cek, A.E. Effect of UV radiation and chitosan coating on the adsorption-photocatalytic activity of TiO₂ particles. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *93*, 582–594. [CrossRef]
- VV- Jurak, M.; Mroczka, R.; Łopucki, R. Properties of Artificial Phospholipid Membranes Containing Lauryl Gallate or Cholesterol.

-
- J. Membr. Biol.* **2018**, *251*, 277–294. [[CrossRef](#)]
- WW- Jurak, M.; Szafran, K.; Cea, P.; Martín, S. Analysis of Molecular Interactions between Components in Phospholipid-Immunosuppressant-Antioxidant Mixed Langmuir Films. *Langmuir* **2021**, *37*, 5601–5616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- XX- Silva, D.; Lima, K.; Bastos, G.; Oliveira, J.; Nascimento, L.D.; Costa, C.; Filho, G.; Concha, V.; Passos, M. PCL/Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aubl.) Hybrid Film for Wound Healing Applications. *Polymers* **2021**, *13*, 1591. [[CrossRef](#)]
- YY- De Moraes, A.R.D.P.; Tavares, G.; Rocha, F.J.S.; de Paula, E.; Giorgio, S. Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. *Exp. Parasitol.* **2018**, *187*, 12–21. [[CrossRef](#)]
- ZZ- Güneş, S.; Tihmnioglu, F. Hypericum perforatum incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 933–943. [[CrossRef](#)]

- AAA-Menzies, K.L.; Jones, L. The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. *Optom. Vis. Sci.* **2010**, *87*, 387–399. [[CrossRef](#)]
- BBB-Pinheiro, J.G.D.O.; Tavares, E.D.A.; Da Silva, S.S.; Silva, J.F.; De Carvalho, Y.M.B.G.; Ferreira, M.R.A.; Araújo, A.A.D.S.; Barbosa, E.G.; Pedrosa, M.D.F.F.; Soares, L.A.L.; et al. Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- CCC-Tovar, C.D.G.; Castro, J.I.; Llano, C.H.V.; Porras, D.P.N.; Ospina, J.D.; Zapata, M.E.V.; Hernandez, J.H.M.; Chaur, M.N. Synthesis, Characterization, and Histological Evaluation of Chitosan-Ruta Graveolens Essential Oil Films. *Molecules* **2020**, *25*, 1688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

APÊNDICE B– Resultado do teste de Tukey na análise de intumescimento das membranas sintetizadas por emulsão do óleo de copaíba, imerso na água e PBS.

	MQ	MQCo-0,1	MQCo-0,5	MQCo-1,0	MQCo-5,0	MQ-pbs	MQCo-0,1pbs	MQCo-0,5-pbs	MQCo-1,0pbs	MQCo-5,0pbs
MQ	0	65,27926667	64,1983	30,5403	25,1259	9,787891358	130,7368	160,701835	4,115292352	4,945018182
MQCo-0,1	65,27926667	0	1,080966667	95,81956667	90,40516667	75,06715802	65,45753333	95,4225683	69,39455902	70,22428485
MQCo-0,5	64,1983	1,080966667	0	94,7386	89,3242	73,98619136	66,5385	96,50353497	68,31359235	69,14331818
MQCo-1,0	30,5403	95,81956667	94,7386	0	5,4144	20,75240864	161,2771	191,242135	26,42500765	25,59528182
MQCo-5,0	25,1259	90,40516667	89,3242	5,4144	0	15,33800864	155,8627	185,827735	21,01060765	20,18088182
MQ-pbs	9,787891358	75,06715802	73,98619136	20,75240864	15,33800864	0	140,5246914	170,4897263	5,672599006	4,842873176
MQCo-0,1pbs	130,7368	65,45753333	66,5385	161,2771	155,8627	140,5246914	0	29,96503497	134,8520924	135,6818182
MQCo-0,5-pbs	160,701835	95,4225683	96,50353497	191,242135	185,827735	170,4897263	29,96503497	0	164,8171273	165,6468531
MQCo-1,0pbs	4,115292352	69,39455902	68,31359235	26,42500765	21,01060765	5,672599006	134,8520924	164,8171273	0	0,82972583
MQCo-5,0pbs	4,945018182	70,22428485	69,14331818	25,59528182	20,18088182	4,842873176	135,6818182	165,6468531	0,82972583	0

APÊNDICE C– Resultado do teste de Tukey na análise de intumescimento das membranas sintetizadas por nanoemulsão do óleo de copaíba, imerso na água e PBS. A cor vermelha indica a diferença estatística significativa entre as composições.

	MQ	MQCoN-0,1	MQCoN-0,5	MQCoN-1,0	MQCoN-5,0	MQ-pbs	MQCoN-0,1- pbs	MQCoN-0,5- pbs	MQCoN- 1,0pbs	MQCoN-5,0- pbs
MQ	0	140,0391	97,9186	121,0598	132,8617	7,596533	64,6985862	110,166001	109,512786	146,4520167
MQCoN-0,1	140,0391	0	42,12053	18,97935	7,177404	147,6357	75,34053938	29,8731242	30,5263398	6,412891102
MQCoN-0,5	97,9186	42,12053	0	23,14118	34,94312	105,5151	33,22001431	12,2474009	11,5941853	48,53341617
MQCoN-1,0	121,0598	18,97935	23,14118	0	11,80194	128,6563	56,36119302	10,8937779	11,5469934	25,39223746
MQCoN-5,0	132,8617	7,177404	34,94312	11,80194	0	140,4583	68,16313533	22,6957202	23,3489357	13,59029515
MQ-pbs	7,596533	147,6357	105,5151	128,6563	140,4583	0	72,29511953	117,762535	117,109319	154,04855
MQCoN-0,1pbs	64,69859	75,34054	33,22001	56,36119	68,16314	72,29512	0	45,4674152	44,8141996	81,75343048
MQCoN-0,5- pbs	110,166	29,87312	12,2474	10,89378	22,69572	117,7625	45,46741517	0	0,65321557	36,28601531
MQCoN-1,0pbs	109,5128	30,52634	11,59419	11,54699	23,34894	117,1093	44,8141996	0,65321557	0	36,93923088
MQCoN-5,0pbs	146,452	6,412891	48,53342	25,39224	13,5903	154,0486	81,75343048	36,2860153	36,9392309	0

APÊNDICE C– Resultado do teste de Tukey na análise de umidade das membranas sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo de copaíba.

A cor vermelha indica a diferença estatística significativa entre as composições.

	MQ	MQCo-0,1	MQCo-0,5	MQCo-1,0	MQCo-5,0	MQCoN-0,1	MQCoN-0,5	MQCoN-1,0	MQCoN-5,0
MQ	0	2,71404204	9,889386517	11,34604367	1,864445103	20,49086689	18,29250969	8,637249449	10,84452882
MQCo-0,1	2,71404204	0	7,175344477	8,632001627	0,849596937	17,77682485	15,57846765	5,923207409	8,130486785
MQCo-0,5	9,889386517	7,175344477	0	1,45665715	8,024941414	10,60148038	8,403123177	1,252137068	0,955142308
MQCo-1,0	11,34604367	8,632001627	1,45665715	0	9,481598564	9,144823225	6,946466027	2,708794218	0,501514842
MQCo-5,0	1,864445103	0,849596937	8,024941414	9,481598564	0	18,62642179	16,42806459	6,772804346	8,980083722
MQCoN-0,1	20,49086689	17,77682485	10,60148038	9,144823225	18,62642179	0	2,198357198	11,85361744	9,646338067
MQCoN-0,5	18,29250969	15,57846765	8,403123177	6,946466027	16,42806459	2,198357198	0	9,655260245	7,447980869
MQCoN-1,0	8,637249449	5,923207409	1,252137068	2,708794218	6,772804346	11,85361744	9,655260245	0	2,207279376
MQCoN-5,0	10,84452882	8,130486785	0,955142308	0,501514842	8,980083722	9,646338067	7,447980869	2,207279376	0

APÊNDICE D – Resultado do teste de Tukey na análise de ângulo de contato das membranas sintetizadas por emulsão e nanoemulsão do óleo de Copaíba. A cor vermelha indica a diferença estatística significativa entre as composições.

	MQ	MQCo-0,1	MQCo-0,5	MQCo-1,0	MQCo-5,0	MQCoN-0,1	MQCoN-0,5	MQCoN-1,0	MQCoN-5,0
MQ	0	16,900	14,167	28,400	1,700	19,467	17,133	1,100	9,700
MQCo-0,1	16,900	0	2,733	45,300	18,600	2,567	34,033	15,800	26,600
MQCo-0,5	14,167	2,733	0	42,567	15,867	5,300	31,300	13,067	23,867
MQCo-1,0	28,400	45,300	42,567	0	26,700	47,867	11,267	29,500	18,700
MQCo-5,0	1,700	18,600	15,867	26,700	0	21,167	15,433	2,800	8,000
MQCoN-0,1	19,467	2,567	5,300	47,867	21,167	0	36,600	18,367	29,167
MQCoN-0,5	17,133	34,033	31,300	11,267	15,433	36,600	0	18,233	7,433
MQCoN-1,0	1,100	15,800	13,067	29,500	2,800	18,367	18,233	0	10,800
MQCoN-5,0	9,700	26,600	23,867	18,700	8,000	29,167	7,433	10,800	0