



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Layla Schlichting

**Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo citral revestidas
com *N*-succinil quitosana aplicadas ao tratamento de feridas cutâneas**

Florianópolis
Julho/2024

Layla Schlichting

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo citral revestidas com *N*-succinil quitosana aplicadas ao tratamento de feridas cutâneas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Físico-química.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Florianópolis

Julho/2024

Schlichting, Layla

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo citral revestidas com N-succinil quitosana aplicadas ao tratamento de feridas cutâneas / Layla Schlichting ; orientador, Alexandre Luis Parize, 2024.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Citral. 3. Nanoemulsões. 4. N-succinil quitosana. 5. Feridas cutâneas. I. Parize, Alexandre Luis. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Layla Schlichting

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo citral revestidas com *N*-succinil quitosana aplicadas ao tratamento de feridas cutâneas

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 29 de julho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.
Instituição UFSC Blumenau

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr.
Instituição Depto Química / UFSC

Prof. Diego Galvan, Dr.
Instituição Depto Química / UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Química.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Orientador

Florianópolis, 2024

Dedico essa dissertação aos meus pais,
pilares da minha formação!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Elayne de Jesus e Adriano da Silva, pelo apoio incondicional, amor e incentivo em todos os momentos da minha vida. Vocês são a minha inspiração e motivação para buscar sempre o melhor. Também quero agradecer a minha amiga de infância Francine Andrade, por ter estado presente em todas as etapas da minha trajetória, inclusive nesta me apoiando.

Ao meu orientador, Alexandre Luis Parize, minha gratidão pela orientação, paciência e dedicação durante todo o desenvolvimento desta dissertação. Suas valiosas contribuições e ensinamentos foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos de pesquisa do grupo POLIMAT, principalmente Rodrigo Henrique Saatkamp, Ana Paula Cardoso, Ângela Graziela da Luz de Andrade Lechinski e Natália B. Caon, com quem compartilhei momentos de aprendizado, desafios e vitórias, agradeço pela parceria, apoio e pelas discussões construtivas.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por proporcionar um ambiente acadêmico de excelência, e aos professores do programa de pós-graduação, pelo conhecimento transmitido ao longo do curso.

Aos funcionários da Central de análise, principalmente Lais S. de Matos e o Paulo A. D. Moraes do LABCROM, que sempre se mostraram prestativos e dispostos a ajudar, minha gratidão pelo suporte.

A Amanda Tavares por ter me ajudado com os aparatos para o *headspace* e por ter me ensinado sobre a técnica, seu apoio foi crucial para este trabalho

Ao LABCQ e a professora Giovana Bazzo com a ajuda nos testes de atividade antibacteriana.

Ao LabCancer, o professor Alfeu e o Jonathan com o apoio nos testes de atividade citotóxica.

Ao LOOSA e a professora Martha com a ajuda nos testes de microscopia de força atômica.

Agradeço, ainda, às agências de fomento, CNPQ e CAPES, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. A todos vocês, meu sincero muito obrigado.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. - Albert Einstein

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e quando lesionada, a mesma passa por quatro etapas de cicatrização: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Em casos específicos, o processo é lento e complexo, devido à suscetibilidade a infecções e perdas de líquidos. O uso de formulações farmacológicas de uso tópico são uma excelente alternativa no tratamento de feridas e tem sido cada vez mais explorados na literatura, principalmente fazendo uso de matrizes e ativos biocompatíveis. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver nanoemulsões com citral revestidas com *N*-succinil quitosana, visando o tratamento tópico de lesões cutâneas. A *N*-succinil quitosana tem como proposta, auxiliar na estabilidade das nanoemulsões e atuar como um agente sinérgico na regeneração de pele, uma vez que já são relatados estudos na literatura. A modificação da quitosana com o anidrido succínico apresentou um grau de modificação de 59% e foi caracterizada por FTIR, RMN, CHN, TGA e DSC. As nanoemulsões pré e pós revestimento dos polímeros mostraram-se estáveis por 90 dias em temperatura ambiente. A microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia de força atômica mostraram que os sistemas apresentam formato esférico, mesmo após o revestimento. O método desenvolvido para quantificação do citral utilizando microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) foi validado com efetividade. Os estudos de citotoxicidade com células embrionárias epiteliais de rim (HEK293) mostraram que as formulações apresentaram viabilidade superior a 100% em 24h de ensaio. O estudo de atividade antibacteriana apresentou um aumento superior da atividade biológica para o citral encapsulado. O estudo apresenta resultados promissores para o uso das nanoemulsões de citral revestidas com *N*-succinil quitosana para o tratamento de lesões cutâneas.

Palavras-chave: citral, nanoemulsões, quitosana, *N*-succinil quitosana, cicatrização

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body, and when injured, it undergoes four stages of healing: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. In specific cases, the process is slow and complex due to susceptibility to infections and fluid loss. The use of topical pharmacological formulations is an excellent alternative in wound treatment and has been increasingly explored in the literature, especially through the use of biocompatible matrices and active ingredients. This study aims to develop citral nanoemulsions coated with N-succinyl chitosan for the topical treatment of skin lesions. N-succinyl chitosan is intended to aid in the stability of the nanoemulsions and act as a synergistic agent in skin regeneration, as studies have already reported in the literature. The modification of chitosan with succinic anhydride achieved a modification degree of 59% and was characterized by FTIR, NMR, CHN, TGA, and DSC. The nanoemulsions, both before and after polymer coating, remained stable for 90 days at room temperature. Transmission electron microscopy and atomic force microscopy showed that the systems have a spherical shape, even after coating. The method developed for the quantification of citral using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) was validated with effectiveness. Cytotoxicity studies with human embryonic kidney epithelial cells (HEK293) showed that the formulations had viability higher than 100% after 24 hours of testing. The antibacterial activity study showed a significant increase in biological activity for the encapsulated citral. The study presents promising results for the use of citral nanoemulsions coated with N-succinyl chitosan for the treatment of skin lesions.

Keywords: citral, nanoemulsions, chitosan, *N*-succinyl chitosan, healing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da anatomia da pele humana.	21
Figura 2. Representação esquemática das quatro etapas de cicatrização da pele...21	21
Figura 3. Representação da estrutura dos isômeros α -citral (geranial) e β -citral (neral) que compõem o a mistura do citral.	26
Figura 4. Esquema representativo do procedimento de emulsificação espontânea..	30
Figura 5. Representação da estrutura da fosfatidilcolina (PC).	31
Figura 6. Representação da estrutura do Pluronic P123.....	32
Figura 7. Esquema reacional da desacetilação da quitina para a obtenção da quitosana.....	33
Figura 8. Representação da estrutura da N-succinil quitosana (NQTS).....	35
Figura 9. Esquema reacional da modificação química da quitosana com anidrido succínico.	38
Figura 10. <i>Debye Plot</i> para determinação da massa molar da NQTS.....	51
Figura 11. Espectros de infravermelho: a) QTS, b) NQTS e c) ácido succínico.....	53
Figura 12. Espectros de ^1H RMN de (a) N-succinil quitosana (NQTS) e (b) quitosana (QTS), com as atribuições de hidrogênio de cada estrutura (c) e (d) respectivamente. Solvente: D_2O e $\text{C}_2\text{DF}_3\text{O}_2$ (80/20 v/v).....	57
Figura 13. Curvas de perda de massa versus a temperatura (a), assim como a derivada primeira da curva de perda de massa (b) para a QTS, NQTS e ácido succínico.	59
Figura 14. Curvas de calorimetria diferencial de varredura para a quitosana e quitosana modificada (a) e ácido succínico (b).	61
Figura 15. Ensaio de solubilidade com influência do pH na NQTS	63
Figura 16. Fenômeno de auto-organização do polímero em NPs. Em a) distribuição de tamanho médio, b) momento em que o sistema ficou com brilho azulado (pH = 3,6) e c) O começo de sua precipitação após adicionar um pouco mais de base.....	64
Figura 17.Resultados das NEs com óleo de abacate (NEB1) e oliva (NEB2). (a) Distribuição de tamanho por DLS, (b) à esquerda formulação com óleo de oliva e à direita com óleo de abacate.	65
Figura 18. Estudo de estabilidade durante 60 dias comparando NEC2 e NEC3, onde os parâmetros avaliados foram: a) Tamanho (nm), b) PDI e c) potencial zeta.	67
Figura 19.Gráficos de distribuição de tamanho de partícula por intensidade.	68

Figura 20. Estudo de estabilidade durante 90 dias das NEs pré e pós revestimento com os polímeros. Onde a), c) e e) são os parâmetros avaliados para as brancas, e b), d) e f) os parâmetros avaliados para as formulações com citral.	71
Figura 21. Gráficos dos perfis a 25 °C feitos pelo equipamento <i>LUMISizer</i> ®. a) NEB; b) NEC; c) NEB@QTS; d) NEC@QTS; e) NEB@NQTS; e f) NEC@NQTS.	73
Figura 22. Gráficos dos perfis a 37 °C feitos pelo equipamento <i>LUMISizer</i> ®. a) NEB; b) NEC; c) NEB@QTS; d) NEC@QTS; e) NEB@NQTS; e f) NEC@NQTS.	74
Figura 23. Imagens de microscopia atômica de transmissão das nanoemulsões sem citral (a) NEB e das nanoemulsões com citral (b) NEC.	76
Figura 24. Imagens de microscopia atômica de transmissão das NE's sem citral revestidas com a quitosana modificada (a) NEB@NQTS e revestida com quitosana (b) NEB@QTS.	77
Figura 25. Imagens de microscopia de força atômica das NE's antes e após o revestimento, onde a, c e e) é da NE branca pura, com QTS e NQTS, respectivamente, e b, d e f) é a NE com citral pura, QTS e NQTS, respectivamente.	79
Figura 26. Cromatograma citral puro, obtido por SPME.	80
Figura 27. Diferentes tempos de extração para uma solução de citral a 6 mg L ⁻¹ (–) 5 minutos de extração, (–), 10 minutos de extração e (–) 20 minutos de extração. .	81
Figura 28. Comparação entre citral solubilizado em água (–) e em matriz NEB (–)	82
Figura 29. Cromatogramas para avaliação da seletividade. a) NEB e b) NEC	83
Figura 30. Curva de calibração do citral em GC-MS por SPME.	84
Figura 31. Resultados ensaio de citotoxicidade para formulações e controles com citral aplicadas a linhagem HEK293	89
Figura 32. Resultados ensaio de citotoxicidade para formulações e controles com citral a linhagem HEK293.	90
Figura 33. Resultado do teste de atividade antibacteriana das formulações: a) Em <i>Staphylococcus aureus</i> e b) Em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91
Figura 34. FTIR da quitosana comercial utilizada.	104
Figura 35. Regressão linear com os dados de viscosidade	107
Figura 36. RMN de ¹ H do ácido succínico em solvente: D ₂ O e C ₂ DF ₃ O ₂ (80/20 v/v)	108
Figura 37. Análise termogravimétrica (a) TG e (b) dTG do ácido succínico.	109
Figura 38. Espectro de massas do Neral (cis-citral).	110
Figura 39. Espectro de massas do Geranial (trans-citral).	110

Figura 40. Cromatogramas sobrepostos utilizados para desenvolver a curva de calibração de citral em matriz NEB, onde (–) 172 mg L ⁻¹ , (–) 240 mg L ⁻¹ , (–) 316 mg L ⁻¹ , (–) 372 mg L ⁻¹ de citral nos quatro pontos respectivamente.....	111
Figura 42. Ensaio de atividade antibacteriana com a NQTS e controles negativos e positivos para comparação. Nos controles negativos as amostras ali são a) Citral puro, b) NEB, c) NEC, d) NEB@NQTS, e) NEC@NQTS e f) NQTS.....	113
Figura 43. Esquema representando o processo de HS-SPME com os equilíbrios envolvidos	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns derivados da quitosana com maior solubilidade em água	34
Tabela 2. Formulação base utilizada para as NEs	40
Tabela 3. Composições das nanoemulsões preparadas durante o trabalho.....	40
Tabela 4. Volume de cada solução utilizada para a confecção das formulações recobertas com QTS e NQTS.	41
Tabela 5. Dados obtidos para determinação da massa molar da NQTS	51
Tabela 6. Dados de massa molar obtidos para a quitosana e a modificada.	52
Tabela 7. Atribuições dos deslocamentos nos espectros de ¹ H com os respectivos hidrogênios em cada polímero	55
Tabela 8. Perda de massa em diferentes estágios e percentual de massa residual em cada material.....	60
Tabela 9. Resultados da análise elementar QTS e NQTS	62
Tabela 10. Resultados DLS para as nanoemulsões brancas.....	65
Tabela 11. Resultados DLS para nanoemulsões com citral.....	65
Tabela 12. Resultados DLS para as formulações antes e após o recobrimento	69
Tabela 13. Índices de instabilidade obtidos para os sistemas pelo <i>LUMISizer</i> ®.....	75
Tabela 14. Curva de calibração do citral em matriz NEB.	83
Tabela 15. Dados do ajuste linear para os pontos da curva de calibração	84
Tabela 16. Ensaio de exatidão para a curva de calibração.....	85
Tabela 17. Resultados obtidos para teores de citral em dois lotes de NEC preparados	86
Tabela 18. Resultado de teor para NEC feita dia 20/06/24	87
Tabela 19. Valores de MIC para o citral e para o óleo de abacate (NEB) nos testes de atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	93
Tabela 20. Dados do experimento utilizando o viscosímetro de <i>Ostwald</i>	106
Tabela 21. Resultados de viscosidade obtidos para as soluções de quitosana.	106
Tabela 22. Dados cromatográficos do citral puro obtidos por GCMS.....	110
Tabela 23. Dados utilizados para construção da curva de calibração do citral em matriz NEB.....	112

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do grau de substituição na síntese da N-succinil quitosana.....	43
Equação 2. Equação de <i>Rayleigh</i> para determinação da massa molar de macromoléculas.	50
Equação 3. Ajuste linear do gráfico de <i>Debye</i> para a NQTS.	51
Equação 4. Determinação do grau de desacetilação da quitosana.....	105
Equação 5. Equação de <i>Mark-Howink-Sakurada</i>	105
Equação 6. Limite da função de viscosidade reduzida do polímero com a concentração tendendo à zero	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹H-RMN - ressonância magnética nuclear de prótons
CHN - análise elementar
COS - quito-oligossacarídeo
DLS - espalhamento de luz dinâmico
DSC - calorimetria diferencial de varredura
ECM - matriz extracelular
EGF - fator de crescimento epidérmico
EIP - ponto de inversão de emulsão
FA - Fase aquosa
FGF - Fator de crescimento de fibroblastos
FO - Fase orgânica
FTIR - Espectroscopia no infravermelho
GCMS - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HS-SPME - microextração em fase sólida por headspace
NEB - nanoemulsão branca
NEB@NQTS - nanoemulsão branca revestida com N-succinil quitosana
NEB@QTS - nanoemulsão branca revestida com quitosana
NEC - nanoemulsão com citral
NEC@NQTS - nanoemulsão com citral revestida com N-succinil quitosana
NEC@QTS - nanoemulsão com citral revestida com quitosana
NEs - nanoemulsões
NLCs - Carreadores lipídicos nanoestruturados
NPs - nanopartículas
NQTS - N-succinil quitosana
PC - Fosfatidilcolina
PEO - poli(óxido de etileno)
PIC - composição de inversão de fase
PIT - temperatura de inversão de fase
PPO - poli(óxido de propileno)
QTS - quitosana
ROS - espécies reativas de oxigênio
SLNs - nanopartículas lipídicas sólidas
TEM - microscopia eletrônica de transmissão
TGA - análise termogravimétrica
TMC - N,N,N-trimetil quitosana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	PELE, LESÕES E CICATRIZAÇÃO.....	20
2.1.1	Tratamentos comercialmente utilizados	24
2.2	O USO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS	25
2.2.1	Citral	26
2.3	NANOTECNOLOGIA NA ENCAPSULAÇÃO DE ATIVOS	27
2.3.1	Nanoemulsões espontâneas	29
2.3.1.1	<i>Componentes da nanoemulsão</i>	30
2.4	O USO DE BIOMATERIAIS NO TRATAMENTO TÓPICO DE FERIDAS ...	32
2.4.1	Biopolímeros	32
2.4.1.1	<i>Quitina e Quitosana</i>	32
2.4.1.2	<i>N-succinil quitosana (NQTS)</i>	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	MATERIAIS.....	38
4.2	MÉTODOS DE PREPARO	38
4.2.1	Síntese da N-Succinil quitosana	38
4.2.2	Elaboração das nanoemulsões (NEs) com citral	39
4.2.3	Recobrimento das NEs com os polímeros QTS e NQTS	40
4.3	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	41
4.3.1	Caracterização da quitosana e sua modificação	41
4.3.1.1	<i>Massa molar por espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	41
4.3.1.2	<i>Análise estrutural dos polímeros (FTIR e ¹H-RMN)</i>	42
4.3.1.3	<i>Avaliação das propriedades térmicas (DSC e TGA)</i>	42
4.3.1.4	<i>Obtenção do grau de modificação química (análise elementar CHN)</i>	42
4.3.1.5	<i>Ensaio de solubilidade com influência do pH na NQTS</i>	43
4.3.2	Caracterização físico-química dos sistemas coloidais	43
4.3.2.1	<i>Análise do tamanho, PDI e potencial zeta (ζ)</i>	43
4.3.2.2	<i>Análise da morfologia pré e pós revestimento</i>	44

4.3.2.2.1	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	44
4.3.2.2.2	Microscopia de força atômica (AFM)	44
4.3.2.3	<i>Quantificação do citral</i>	44
4.3.2.3.1	Análise por GC-MS	45
4.3.2.3.2	Procedimento de microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (HS-SPME)	45
4.3.2.3.3	Construção e validação da curva de calibração.....	46
4.3.2.4	<i>Estudo de estabilidade dos sistemas coloidais (LUMISizer®)</i>	47
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	47
4.4.1	Teste de citotoxicidade	47
4.4.2	Atividade antibacteriana	48
4.4.2.1	<i>Reativação das Cepas</i>	48
4.4.2.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) através do método de microdiluição</i>	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA N-SUCCINIL QUITOSANA.....	50
5.1.1	Determinação da massa molar	50
5.1.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	50
5.1.3	Análise de ressonância nuclear magnética de próton (¹H-RMN) para os polímeros	54
5.1.4	Avaliação das propriedades térmicas por DSC e TGA	58
5.1.4.1	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	58
5.1.4.2	<i>Calorimetria de varredura diferencial (DSC)</i>	60
5.1.5	Obtenção do grau de modificação química para a NQTS	61
5.1.6	Ensaio de solubilidade com influência do pH na NQTS	62
5.2	PREPARO DAS NANOEMULSÕES E SEU REVESTIMENTO	64
5.2.1	Condições iniciais para escolha da formulação final	64
5.2.2	Avaliação do tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos sistemas pré e pós revestimento	68
5.2.3	Estabilidade dos sistemas preparados por DLS	69
5.2.4	Estabilidade acelerada por LUMISizer®	72
5.2.5	Análise da morfologia das nanoemulsões revestidas através de TEM76	
5.2.6	Análise da morfologia das nanoemulsões revestidas através de AFM77	

5.3	QUANTIFICAÇÃO DO CITRAL.....	80
5.3.1	Resultados da otimização/cromatogramas obtidos para o citral	80
5.3.2	Elaboração da curva de calibração e validação analítica pro citral	82
5.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	87
5.4.1	Ensaio de citotoxicidade das formulações finais	87
5.4.2	Ensaio de atividade antibacteriana	91
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE A: CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA COMERCIAL UTILIZADA	104
	APÊNDICE B: RMN DE ¹ H DO ÁCIDO SUCCÍNICO	108
	APÊNDICE C: TG DO ÁCIDO SUCCÍNICO	109
	APÊNDICE D: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO PARA O CITRAL PURO.....	110
	APÊNDICE E: CROMATOGRAMAS E VALORES DE ÁREAS DE PICOS UTILIZADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO CITRAL POR HS- SPME GCMS	111
	APÊNDICE F: CONTROLES UTILIZADOS NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	113
	ANEXO A: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA POR HEADSPACE (HS- SPME).....	113

1 INTRODUÇÃO

A pele é o órgão de maior extensão do corpo humano, constituída por três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme. Quando a pele é lesionada, ela passa pelo processo de cicatrização que é dividido em quatro grandes etapas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Para pacientes com grandes lesões cutâneas ou feridas crônicas o processo cicatrização é lento e difícil de curar, devido à sua suscetibilidade a infecções e perdas de líquidos. Atualmente, a literatura científica relata tratamentos alternativos que podem auxiliar nessas condições, sendo um deles o uso de ativos biocompatíveis e biodegradáveis de origem natural, como o citral.

O citral é componente principal do óleo essencial de capim-limão e apresenta inúmeras propriedades biológicas, dentre as quais podemos destacar a atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral. Porém, o citral é muito pouco solúvel em água, o que torna difícil sua aplicação como fármaco ou em aplicações tópicas, assim ressalta-se também em estudos científicos a importância dele estar associado ou encapsulado em uma formulação. Estratégias com sistemas de liberação controlada de fármacos vem sendo estudadas para aplicar em compostos como o citral, que possuem alto potencial farmacológico e baixa solubilidade em água. Uma delas, a nanoencapsulação, por uso de nanoemulsões, figuram como uma boa alternativa para melhorar o efeito terapêutico do citral, fazendo com que sua biodisponibilidade aumente, protegendo o ativo da degradação (ou volatilização) e melhore sua permeação no meio biológico.

No entanto, aplicações tópicas são um desafio para as nanoemulsões, mesmo que estas possuam maior poder penetrante no tecido, por conta de sua baixa estabilidade termodinâmica e tendência a sofrer fenômenos de separação de fases. Assim a estabilização das nanoemulsões por uso de polímeros é uma alternativa viável no preparo destas amostras, e deste modo neste estudo foi utilizado o biopolímero quitosana para esta estabilização.

A quitosana, polímero renovável e abundante, que possui propriedades mucoadesivas e antimicrobianas foi utilizada para revestir as nanoemulsões, aumentando a adesão no tecido a ser tratado, como também, ampliando o efeito terapêutico do fármaco, mas também estabilizando a formulação e estendendo seu tempo de prateleira.

Todavia a quitosana possui solubilidade restrita em meio aquoso, o que interfere na sua utilização em tratamentos que pH's acima de 6,8 sejam requeridos ou em um sistema de liberação de fármacos. Assim, é possível modificar quimicamente a estrutura da quitosana para aprimorar e obter derivados que apresentem melhoria nas suas propriedades de solubilidade aquosa, como por exemplo a *N*-succinil quitosana, além de apresentar como características adicionais a ação cicatrizante e o maior efeito bactericida, o que muitas vezes é requerido em aplicações biológicas. Além disso, o derivado pode auxiliar em melhorar propriedades de moléculas ativas no que se refere a incorporação e permeação.

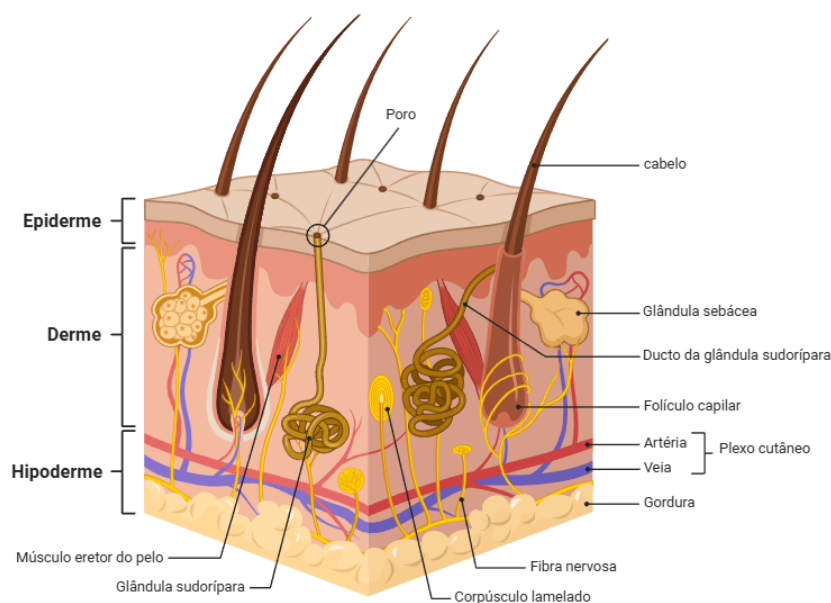
Com isso, o objetivo deste trabalho é elaborar uma nanoemulsão contendo o ativo citral e revesti-la com o polímero *N*-succinil quitosana, com o intuito de ser aplicada como um spray no tratamento de feridas cutâneas. Acredita-se que o polímero irá atuar na maior adesão do sistema desenvolvido na pele, potencializando o efeito do ativo, além do efeito cicatrizante da *N*-succinil quitosana e a maior biodisponibilidade do citral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE, LESÕES E CICATRIZAÇÃO

A pele é o órgão de maior extensão do corpo humano, constituída por três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme, cada uma com funções distintas para regular e proteger o corpo (Figura 1). A camada mais externa, epiderme, é composta por células como queratinócitos, células de Merkel, melanócitos e células de *Langerhans*, sendo queratinócitos os principais envolvidos na cicatrização epidérmica e na função de barreira (Kolimi *et al.*, 2022; Smythe; Wilkinson, 2023). A derme, localizada abaixo da epiderme, é um tecido conjuntivo abundante em componentes da matriz extracelular, vasos sanguíneos, fibroblastos e estruturas sensoriais, auxiliando para a força e elasticidade da pele (Kolimi *et al.*, 2022). A hipoderme, situada abaixo da derme, é formada por tecido adiposo que fornece amortecimento e reservas de energia para o corpo (Kolimi *et al.*, 2022). Em conjunto, essas camadas formam uma estrutura complexa que protege contra fatores externos, regula a temperatura corporal e facilita as funções metabólicas, o que ressalta o papel vital da pele na manutenção da saúde e do bem-estar geral. Além disso, o microbioma cutâneo desempenha uma função crucial na manutenção da homeostase e na proteção contra patógenos, com diferentes regiões da pele abrigando microrganismos específicos adaptados a condições ambientais variadas, como pH, umidade e quantidade de sebo (Smythe; Wilkinson, 2023).

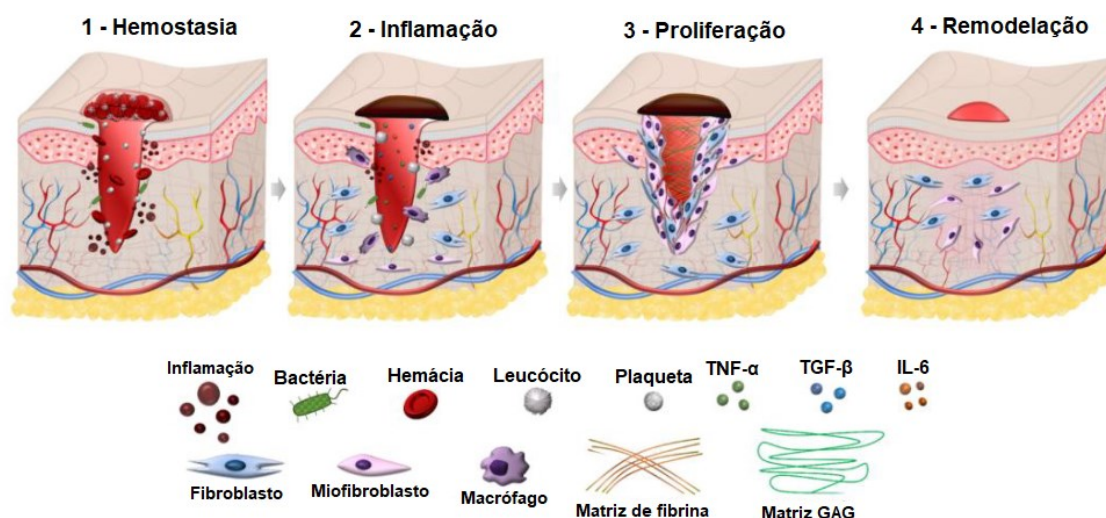
Figura 1. Representação esquemática da anatomia da pele humana.



Fonte: Adaptado de Kolimi et al, 2022. Criado com BioRender.com.

Quando a pele é lesionada, ela passa por uma série de respostas que variam conforme a profundidade e a extensão da ferida (Figura 2). Uma ferida é definida como a interrupção da estrutura e função anatômica (Hama *et al.*, 2023). As feridas podem ser classificadas como superficiais, de espessura parcial ou total, dependendo das camadas da pele afetadas, podendo comprometer desde a epiderme até tecidos mais profundos, como vasos sanguíneos e gordura (Deng; Gould; Ali, 2022).

Figura 2. Representação esquemática das quatro etapas de cicatrização da pele.



Fonte: Adaptado de Trinh *et al* (2022).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que substitui tecidos danificados por novas estruturas celulares e visa restaurar a função da pele. Essencial para a recuperação de lesões, a cicatrização envolve uma sequência de eventos biológicos divididos em quatro fases principais: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Deng; Gould; Ali, 2022; Trinh *et al.*, 2022).

A cicatrização inicia-se imediatamente após a lesão com a fase de hemostasia, cujo principal objetivo é controlar a perda de sangue e formar um coágulo. Neste estágio, os vasos sanguíneos se contraem, e as plaquetas se agregam no local do ferimento, liberando fatores de coagulação que formam uma rede de fibrina, criando um tampão hemostático (Eming; Martin; Tomic-Canic, 2014; Hama *et al.*, 2023). O coágulo e o tecido circundante da ferida liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (Guo; Dipietro, 2010).

Após o controle do sangramento, inicia-se a fase inflamatória, caracterizada pela migração de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e linfócitos para a ferida, em um processo conhecido como quimiotaxia (Broughton; Janis; Attinger, 2006; Campos; Groth; Branco, 2008; Gosain; DiPietro, 2004). Os neutrófilos desempenham um papel crucial na eliminação de micróbios invasores e detritos celulares, embora também liberem substâncias como proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos colaterais aos tecidos adjacentes (Guo; Dipietro, 2010; Rodrigues *et al.*, 2019).

A fase proliferativa segue e se sobrepõe à inflamatória, sendo caracterizada pela proliferação e migração epitelial sobre a matriz provisória dentro da ferida (reepitelização) (Guo; Dipietro, 2010; Rodrigues *et al.*, 2019). Fibroblastos e células endoteliais são as células mais proeminentes nesta etapa, sustentando o crescimento capilar, a formação de colágeno e a formação do tecido de granulação no local da lesão (Rodrigues *et al.*, 2019). Dentro do leito da ferida, os fibroblastos produzem colágeno, bem como glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que são componentes principais da matriz extracelular (ECM) (Guo; Dipietro, 2010).

Após uma robusta proliferação e síntese de ECM, a cicatrização da ferida entra na fase final de remodelação, que pode durar anos. Nesta fase, o tecido de granulação é substituído por uma cicatriz permanente, e a produção de colágeno continua ativamente por 4 a 5 semanas, seguida pela substituição do colágeno reticular tipo III pelo colágeno fibrilar tipo I ao longo do ano seguinte (Almadani *et al.*,

2021; Rodrigues *et al.*, 2019). Durante esse período, há uma regressão de muitos dos novos capilares formados, normalizando a densidade vascular da ferida. A cicatrização também envolve uma contração física ao longo do processo, mediada por fibroblastos contráteis (miofibroblastos) presentes na ferida (Campos; Groth; Branco, 2008; Gosain; DiPietro, 2004; Guo; Dipietro, 2010).

As feridas podem ser divididas em dois grupos: agudas e crônicas. Entre pacientes saudáveis, uma ferida aguda pode ser facilmente curada em 2 a 3 semanas, pela própria propriedade de autocura da pele, restaurando sua integridade funcional e anatômica (Deng; Gould; Ali, 2022; Kolimi *et al.*, 2022). Já grandes lesões cutâneas e feridas crônicas possuem cicatrização lenta e são difíceis de curar devido à sua suscetibilidade a infecções e perdas de líquidos. Existem multifatores que podem causar lesões crônicas na pele, mas geralmente ocorrem por condições patológicas, como diabetes ou doenças autoimunes, afetando milhões de pessoas no mundo todo (~8,2 milhões de pessoas) (Kolimi *et al.*, 2022; Trinh *et al.*, 2022). Nessas feridas crônicas, o tecido danificado é maior do que a área visível, e os tecidos subjacentes e ao redor do local da ferida também são afetados, podendo evoluir para uma úlcera (Eming; Martin; Tomic-Canic, 2014). Casos de inflamação crônica, como úlceras por pressão, queimaduras graves e úlceras diabéticas, também podem retardar o processo de cicatrização devido à capacidade comprometida de regenerar o tecido (Deng; Gould; Ali, 2022; Eming; Martin; Tomic-Canic, 2014). Outro problema na cicatrização de lesões é a infecção da ferida, que pode ser causada pela presença de microrganismos como bactérias e fungos. Isso pode enfraquecer o sistema imunológico e levar ao retardo na cicatrização de feridas. Biofilmes bacterianos gerados por bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* podem exacerbar os danos nos tecidos e atrasar a cicatrização, destacando a necessidade crítica de estratégias inovadoras para enfrentar esses desafios (Deng; Gould; Ali, 2022). Compreender esses problemas é crucial para o desenvolvimento de estratégias inovadoras para acelerar o processo de cicatrização de feridas, particularmente no caso de feridas crônicas.

2.1.1 Tratamentos comercialmente utilizados

Para saber qual o tratamento é mais adequado para cada tipo de ferida, é necessário realizar uma abordagem sistemática para avaliação e tratamento da lesão, principalmente se for crônica. Essa abordagem pode adotar as diretrizes 'TIME', que seriam: avaliação do tecido (T) e desbridamento de tecidos necrosados, controle de infecção/inflamação (I) e avaliação de etiologia, equilíbrio de umidade (M) e avanço da borda epitelial (E), justamente por se tratar de lesões graves ou lesões que perduram por semanas ou até meses (Kolimi *et al.*, 2022). A partir disso, existem várias práticas convencionais de tratamento de feridas, desde procedimentos cirúrgicos, enxertos, uso de pomadas antibióticas, até curativos comuns ou hidrocoloides. Dentre a classe de curativos convencionais, estes desempenham duas funções básicas: cobrir a ferida, prevenindo infecções; aliviar a dor da ferida, por reduzir a carga bacteriana e conseqüentemente diminuindo a resposta inflamatória (Deng; Gould; Ali, 2022). Atualmente existem diversos curativos disponíveis no mercado. No caso de incisões cirúrgicas, é recomendado manter o curativo seco e ocluso de 24 a 48 horas. Entretanto, para feridas abertas a abordagem de tratamento evoluiu para o uso de curativos úmidos, pois a manutenção do ambiente úmido estimula a epitelização e formação de tecido de granulação, evita a perda excessiva de líquidos prevenindo a desidratação tecidual, entre outras vantagens (Franco; Gonçalves, 2008).

O tratamento com formulações tópicas para administração de fármacos à pele também é a via mais comum utilizada comercialmente, que inclui géis, emulsões, pastas, cremes, loções, entre outros. Geralmente são utilizados antibióticos tópicos, em formas de pomada ou cremes, com ativos como neomicina e sulfadiazina de prata, que auxiliam na prevenção de infecções bacterianas durante a fase inflamatória da cicatrização. No entanto, deve ser usado com cautela para evitar hipersensibilidade ou alergias (Franco; Gonçalves, 2008; Kolimi *et al.*, 2022). Existem também outras formulações tópicas contendo colagenase e dexpanthenol, muito utilizadas para auxiliar o processo de cicatrização, no controle de proliferação de fibroblastos e acelerando a reepitelização (Franco; Gonçalves, 2008; Kolimi *et al.*, 2022).

Apesar das opções de tratamento disponíveis comercialmente, atualmente nenhum método isolado é capaz de promover a cicatrização completa de todos os tipos de feridas. Além disso, há poucas alternativas que possam ser eficazes em todas

as fases do processo de cicatrização. Como o processo cicatricial está em constante evolução, o tratamento ideal em um dia pode não ser mais eficaz no dia seguinte (Franco; Gonçalves, 2008; Kolimi *et al.*, 2022).

2.2 O USO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS

Compostos naturais, extraídos de plantas e animais, têm sido utilizados há milênios para o tratamento de feridas, uma prática fundamentada em tradições medicinais como as da China e da Índia. Estes compostos são valiosos devido à sua abundância e eficácia em promover a cura. Eles são classificados de acordo com suas bioatividades, destacando-se as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas e a promoção de colágeno, que são as mais amplamente estudadas e aplicadas (Trinh *et al.*, 2022). Por exemplo o Lupeol, um triterpeno presente principalmente em árvores *Bowdichia virgilioidesm*, mas também em frutas como manga, soja e azeitona (Pereira Beserra *et al.*, 2020). Há estudos com Lupeol que indicaram atividade antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética, além da capacidade dele de acelerar o processo de cicatrização (Alqahtani *et al.*, 2013; Badshah *et al.*, 2016; Beserra *et al.*, 2019; Sudhahar; Kumar; Varalakshmi, 2006).

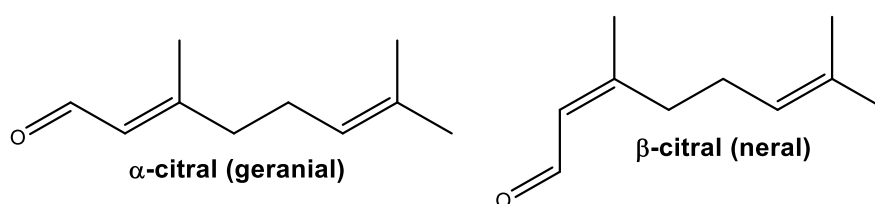
Outro composto de origem natural com muitas propriedades bioativas é a Curcumina, extraída principalmente da raiz de cúrcuma (*Curcuma longa L.*). Estudos apontaram ações antioxidante, anti-inflamatória e anticoagulante. (Chainani-Wu, 2003; Joe; Vijaykumar; Lokesh, 2004). Além disso, vários trabalhos demonstraram os efeitos cicatrizantes da curcumina como antioxidante (Bonté *et al.*, 1997; Mohanty; Das; Sahoo, 2012; Phan *et al.*, 2001), mostrando o impacto da curcumina na cicatrização de feridas e seu uso como tratamento alternativo a fármacos sintéticos.

Compostos naturais com propriedades antibacterianas podem principalmente atuar na fase de inflamação do processo de cicatrização de feridas (Trinh *et al.*, 2022). A atividade antibacteriana de um composto pode ser atribuída a dois mecanismos: a inibição da síntese de componentes vitais das bactérias ou a supressão da resistência antibacteriana (Khameneh *et al.*, 2019). Um composto natural com excelente atividade antibacteriana é o óleo essencial de capim-limão, extraído de capim-cidreira, que apresenta um grande potencial antimicrobiano (Mukarram *et al.*, 2021), e este potencial é atribuído ao seu componente majoritário, o citral, escolhido com ativo para este trabalho.

2.2.1 Citral

Citral é o principal componente do óleo essencial de capim limão e é considerado o constituinte responsável pela atividade biológica do mesmo (Gao *et al.*, 2020; Majewska *et al.*, 2019). Também considerado como um marcador de qualidade, deve existir no mínimo 75% de citral no óleo essencial de capim-limão para alcançar o potencial medicinal deste produto (Majewska *et al.*, 2019; Mukarram *et al.*, 2021). Este composto é uma mistura de dois aldeídos estereoisômeros monoterpênicos: o geranial, também chamado de trans-citral ou α -citral, e o neral, também denominado de cis-citral ou β -citral (Figura 3). Macroscopicamente o citral se apresenta como um líquido amarelo, volátil e praticamente insolúvel em água, com um coeficiente de partição octanol/água de aproximadamente 3. Possui massa molar 152,23 g.mol⁻¹ (Silva; Bárbara, 2022).

Figura 3. Representação da estrutura dos isômeros α -citral (geranial) e β -citral (neral) que compõem o a mistura do citral.



Fonte: Adaptado de Majewska et al (2019). Criado com ChemDraw®.

Este monoterpreno de aldeído têm sido alvo de muito interesse na comunidade científica de produtos naturais, porque além de ser biocompatível, possui atividade antibacteriana (Gao *et al.*, 2020), antifúngica (Wei *et al.*, 2021), anti-inflamatória (Majewska *et al.*, 2019), anti-mofo (Shan *et al.*, 2022), anti-tumoral, antioxidante, entre outras (Mukarram *et al.*, 2021). Com isso, são inúmeras possibilidades de aplicação que se pode ter com o citral, sendo de grande relevância para a indústria farmacêutica e alimentícia. Contudo, devido sua baixa solubilidade em água e alta volatilidade, se torna muito difícil incorporar o citral como tratamento alternativo para infecções ou inflamações. Com isso, a nanoencapsulação desde ativo pode ser uma alternativa viável para tornar ele solúvel em água, com o uso de nanocarreadores como nanopartículas poliméricas ou o uso de surfactantes para formar uma nanoemulsão. Dessa forma o material bioativo é protegido do exterior, tendo sua biodisponibilidade

aumentada, tendo sua liberação controlada e direcionada, entre outras vantagens (Bonferoni *et al.*, 2017; Luciano *et al.*, 2023; Soltanzadeh *et al.*, 2021).

2.3 NANOTECNOLOGIA NA ENCAPSULAÇÃO DE ATIVOS

A nanotecnologia envolve o *design* e a fabricação de estruturas em níveis atômicos, moleculares ou macromoleculares, permitindo a manipulação eficiente da estrutura básica dos materiais em nanoescala. Desse modo, abordagens que utilizam nanotecnologia podem ser aplicadas para resolver problemas de solubilidade relacionados a diversas moléculas em meios aquosos e lipídicos (Dutt *et al.*, 2023; Pandey; Kohli, 2020). As nanoformulações demonstram superioridade na absorção de medicamentos devido a suas propriedades físico-químicas otimizada. Com tamanhos variando entre 10 e 1000 nm, essas formulações oferecem uma maior área de superfície específica, facilitando a administração dos medicamentos. Sua capacidade de contornar os mecanismos de depuração do organismo e alcançar locais específicos contribui para a eficácia terapêutica, reduzindo a toxicidade e os efeitos colaterais. Esses nanossistemas não apenas protegem os medicamentos da decomposição prematura, mas também permitem a liberação controlada, resultando na redução da dose total utilizada. A aplicação de nanopartículas (NPs) em produtos tópicos melhora a permeação e penetração dos compostos bioativos nas camadas mais profundas da pele, proporcionando um efeito de revestimento com liberação sustentada de fármacos e direcionamento celular específico (Raszewska-Famielec; Flieger, 2022).

As nanopartículas (NPs) podem ser compostas por uma variedade de materiais que interagem com os componentes da pele, regulando a penetração nas suas camadas. Existem diferentes tipos de NPs, como nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), lipossomas, Carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), nanoemulsões, NPs poliméricos e NPs inorgânicos. Nanoemulsões, devido à sua baixa tensão interfacial e excelentes propriedades umectantes, garantem uma deposição uniforme na superfície da pele. As NPs à base de lipídios formam camadas homogêneas no estrato córneo e prolongam o tempo de permanência, o que favorece a interação com as camadas da pele e modula suas propriedades de barreira (Dutt *et al.*, 2023; Raszewska-Famielec; Flieger, 2022).

As nanoemulsões podem ser definidas como dispersões coloidais entre dois ou mais líquidos imiscíveis, geralmente óleo em água (o/a), cujo tamanho de gotícula é menor que 200 nm (McClements, David J.; Jafari, 2018). As gotículas são estabilizadas por uma camada emulsificante, que de maneira geral é composta por algum polímero ou tensoativo biocompatível na indústria alimentícia/farmacêutica. Esses agentes emulsificantes podem trazer às nanoemulsões propriedades desejadas, como maior tempo de estabilização do sistema, capacidade de carga, entre outras. O aumento da área superficial das gotículas, juntamente com a redução no tamanho das partículas em nanoemulsões (NEs), resulta em uma maior eficácia dos ativos nelas contidos. Como a maioria desses compostos tende a ser lipofílica, as nanoemulsões óleo em água (o/a) são comumente utilizadas para melhorar a solubilidade e dispersão de ativos lipofílicos em ambientes aquosos. Esta abordagem visa não apenas aumentar a estabilidade, mas também aprimorar a aparência, sabor e textura dos produtos, além de potencializar a absorção e a biodisponibilidade dos compostos (Liu *et al.*, 2019; Mushtaq *et al.*, 2023).

As nanoemulsões apresentam estabilidade cinética por conta do tamanho pequeno de gotícula, porém são sistemas fora de equilíbrio que tendem a se separar em duas fases, uma vez que a energia livre necessária para isto é menor do que para a emulsificação. Com isso, é comum esses sistemas se decomporem durante o armazenamento devido a vários mecanismos, como amadurecimento de Ostwald, floculação, coalescência e separação gravitacional (Graván *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2019; McClements, David J.; Jafari, 2018). Uma forma de contornar esse problema é com o uso de polímeros anfifílicos como estabilizadores físicos, de modo que as porções hidrofílicas dos polímeros ficam hidratadas em meio aquoso, combinando a estabilização estérica com a atividade interfacial (Bonferoni *et al.*, 2017).

Existem duas abordagens principais para a fabricação de nanoemulsões, a primeira envolve o uso de alta energia, também conhecida como método destrutivo ou "*Top-down*", que utiliza dispositivos mecânicos para criar nanoemulsões. Nesse método, máquinas geram forças disruptivas intensas para quebrar a fase macroscópica em pequenas gotículas. Os dispositivos mecânicos de alta energia incluem homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e ultrassonicadores. A grande vantagem dessa forma de preparo de sistemas coloidais é o fato de ser mais aplicável em indústria (escalonamento) e há uma maior facilidade na escolha do surfactante, entretanto, por ser um método de alta energia, os custos de produção

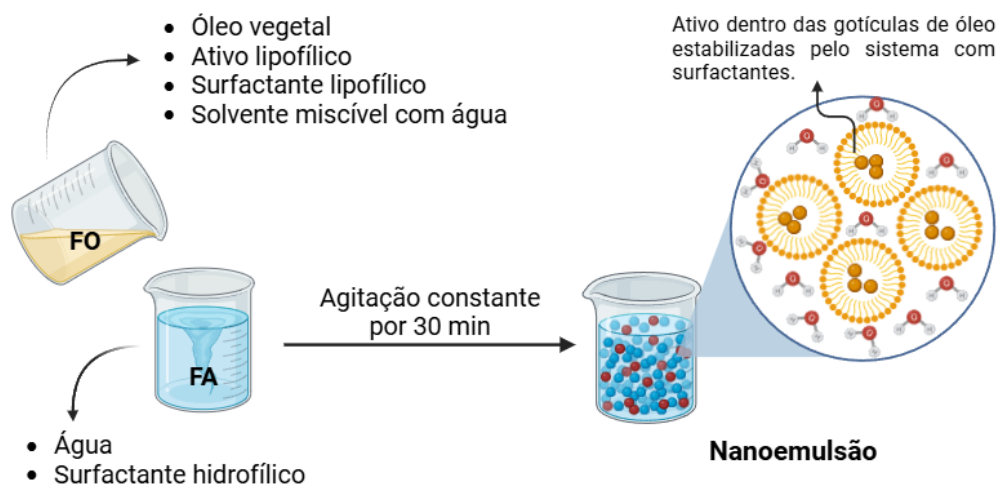
costumam ser elevados, além de que podem degradar princípios ativos sensíveis a altas temperaturas (Safaya; Rotliwala, 2020). A segunda abordagem utiliza métodos de baixa energia, conhecidos como método construtivo ou "*Bottom-up*", onde as nanoemulsões são formadas a partir de mudanças nas condições ambientais ou na composição da mistura. Estes métodos promovem o desenvolvimento de nanogotículas de óleo em sistemas mistos contendo surfactantes, óleo e água. Essa forma de preparo tem a vantagem de não precisar utilizar alto consumo de energia, porém é de difícil escalonamento e utiliza altas quantidades de surfactante para garantir formação e estabilização do sistema, podendo ser levemente tóxico para as células por levar à fluidização na membrana (dos Santos Ramos *et al.*, 2020). As técnicas de baixa energia incluem composição de inversão de fase (PIC), emulsificação espontânea, ponto de inversão de emulsão (EIP) e temperatura de inversão de fase (PIT) (Karthik; Saravana Raj; Pavithra, 2022; Liu *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2015).

2.3.1 Nanoemulsões espontâneas

A técnica de emulsificação espontânea consiste na diluição de uma fase orgânica (FO), que contém um solvente parcialmente miscível (como acetona, etanol ou acetato de etila), óleo (fase dispersa), e um surfactante lipofílico, em uma fase aquosa (FA) que possui um surfactante hidrofílico. Este processo é geralmente realizado por gotejamento sob agitação leve, ocorrendo à temperatura e pressão ambiente (Bouchemal *et al.*, 2004; Safaya; Rotliwala, 2020; Singh *et al.*, 2017). Durante a diluição, o solvente miscível migra para a fase aquosa, causando uma turbulência intensa na interface óleo-água. Essa turbulência rompe as gotículas de óleo, formando nanogotículas que são rapidamente estabilizadas pelos surfactantes presentes no sistema (Figura 4) (Bouchemal *et al.*, 2004; Safaya; Rotliwala, 2020; Schlichting, 2023; Singh *et al.*, 2017). Nessa abordagem, o processo é impulsionado pela difusão, ocorrendo quando dois líquidos imiscíveis são misturados em condições de não equilíbrio, devido ao gradiente de potencial químico entre as fases. O tamanho das gotículas de emulsão formadas pode ser controlado ajustando a composição da fase inicial e as propriedades físico-químicas, como temperatura e velocidade de agitação. Embora a emulsificação espontânea geralmente não requeira energia externa, em alguns casos, a aplicação de energia, como agitação ou aquecimento, é

utilizada para acelerar a formação do sistema (Mushtaq *et al.*, 2023; Nirmala *et al.*, 2022).

Figura 4. Esquema representativo do procedimento de emulsificação espontânea.



Fonte: Adaptado de Schlichting (2023). Criado com BioRender.com.

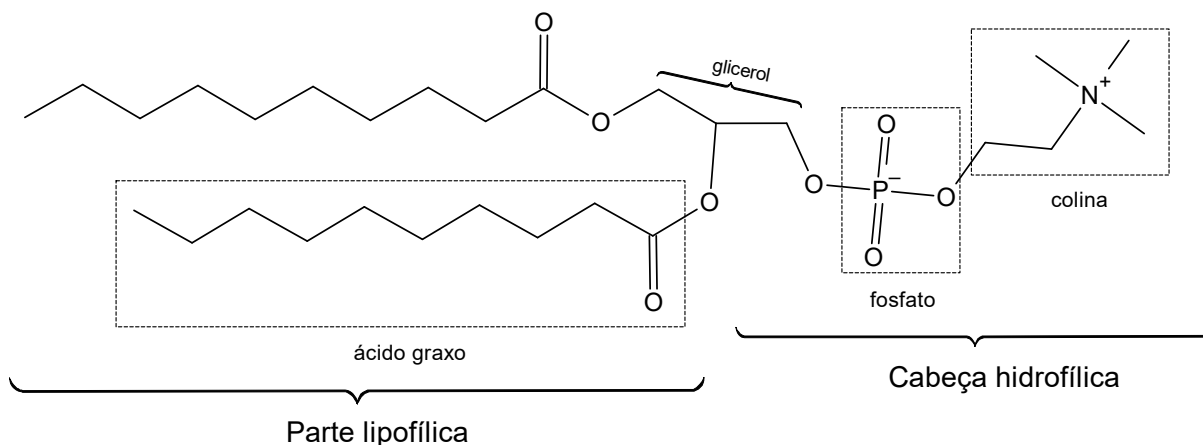
2.3.1.1 Componentes da nanoemulsão

De modo geral, uma nanoemulsão é composta por uma fase aquosa, uma fase oleosa e um emulsificante. Para diversos usos comerciais, é essencial que produtos à base de nanoemulsões mantenham sua estabilidade físico-química mesmo quando expostos a condições ambientais adversas, como variações de temperatura, forças mecânicas e força iônica, durante a produção, armazenamento, transporte e aplicação. Para retardar e evitar a desestabilização do sistema, adicionam-se estabilizantes adequados, como emulsificantes, agentes de pesagem, modificadores de textura e inibidores de amadurecimento. Esses aditivos ajudam a preservar a estabilidade física das nanoemulsões, garantindo sua eficácia e durabilidade (Bouchemal *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2019; Mushtaq *et al.*, 2023).

A lecitina é um exemplo de surfactante muito utilizado para estabilizar emulsões e nanoemulsões, principalmente por possuir características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e elevada pureza. Sua composição é dada por uma mistura de fosfolipídios polares e não polares, devendo conter ao menos 60% de lipídios polares (Saatkamp, 2019). A lecitina utilizada neste trabalho foi a lecitina de soja, que é constituída majoritariamente por fosfatidilcolina (PC) (Figura 5). Esse

fosfolípido é composto por uma molécula de glicerol, esterificada em suas posições 1 e 2 com ácidos graxos, e na posição 3 com um grupo fosfato, e este último ainda é esterificado com um álcool adicional (Van Hoogevest; Fahr, 2019).

Figura 5. Representação da estrutura da fosfatidilcolina (PC).

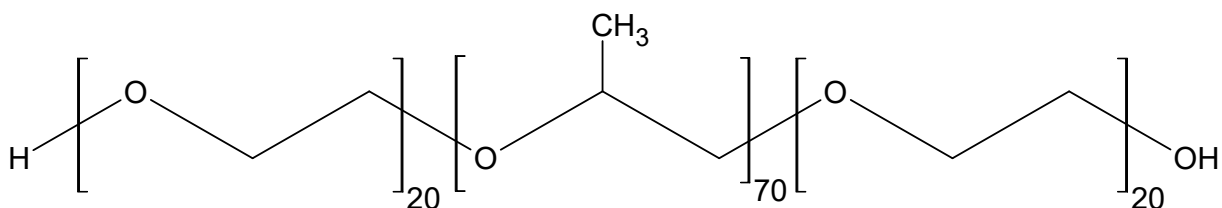


Fonte: Autora, adaptado de Van Hoogevest; Fahr, (2019). Criado com ChemSketch®.

No entanto, lecitinas isoladas geralmente não formam sistemas muito estáveis, sendo comum a sua combinação com outros emulsificantes para se obter uma maior estabilidade (Klang; Valenta, 2011; Ma; Davidson; Zhong, 2016). A combinação de lecitinas com polímeros não iônicos, como os do tipo Pluronic®, tem se mostrado eficaz na produção de nanoemulsões (NEs) estáveis (Bouchemal *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2023).

Os polímeros do tipo Pluronic® (Figura 6), também conhecidos como poloxâmeros, são copolímeros em bloco do tipo (ABA) que exibem propriedades anfífilas devido à sua composição de segmentos com diferentes solubilidades (Pitto-Barry; Barry, 2014). Eles consistem em um bloco central mais hidrofóbico de poli(óxido de propileno) (PPO), flanqueado por blocos mais hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO). Essa estrutura única permite que os Pluronic® atuem como emulsificantes eficazes, estabilizando nanoemulsões ao reduzir a tensão interfacial e auxiliando na formação de sistemas homogêneos e estáveis. A combinação de lecitinas com Pluronic® tem mostrado aumentar a estabilidade de nanoemulsões, aproveitando a capacidade dos Pluronic® de auto-organizar-se em micelas e atuar como agentes estabilizantes em sistemas aquosos e oleosos (Bouchemal *et al.*, 2004; Klang; Valenta, 2011; Ma; Davidson; Zhong, 2016; Zhao *et al.*, 2023).

Figura 6. Representação da estrutura do Pluronic P123



Fonte: Adaptado de Saatkamp (2019). Criado com ChemSketch®.

O uso de óleos vegetais como veículos para os compostos bioativos também é uma estratégia utilizada para aprimorar a estabilidade física de nanoemulsões (McClements, David J.; Jafari, 2018).

A escolha dos óleos de abacate e oliva foi no intuito de incorporá-los a formulação com função de não só carrear o ativo, mas também complementar sua atividade biológica, tanto o óleo de abacate quanto o de oliva já foram reportados no meio acadêmico com potencial efeito bactericida e fungicida (Hanan *et al.*, 2018; Hatami; Mohamadi Sani; Yavarmanesh, 2016). Ambos os óleos são ricos em ácidos graxos, principalmente ácido oleico, porém o óleo de abacate possui uma porcentagem maior de gorduras saturadas, e o óleo de oliva apresenta maior composição de gorduras monoinsaturadas (Amra *et al.*, 2022).

O óleo de abacate também demonstrou aumentar a permeação de fármacos pela pele, sendo de grande relevância científica para a aplicação de formulações tópicas (Amra *et al.*, 2022). No trabalho de Kiattisin *et al.*, (2024), foram desenvolvidas nanoemulsões com óleo de abacate que apresentaram resultados de maior estimulação de colágeno em células de fibroblastos humanas quando comparado ao controle, indicando potencial para área de cicatrização de feridas e *anti-aging*.

2.4 O USO DE BIOMATERIAIS NO TRATAMENTO TÓPICO DE FERIDAS

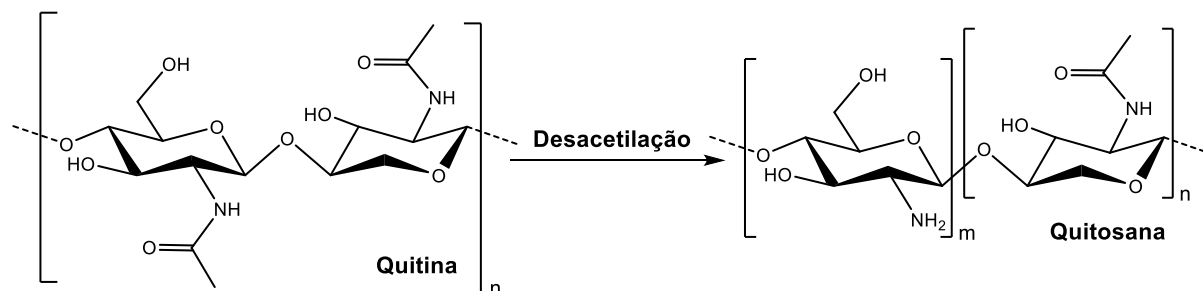
2.4.1 Biopolímeros

2.4.1.1 Quitina e Quitosana

A quitina é um polímero de ocorrência natural, geralmente isolada de exoesqueletos de camarões, e é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. Entretanto a quitina possui uma estrutura compacta no estado sólido, sendo insolúvel na maior parte dos solventes. A partir dela é feito o

processo de desacetilação (Figura 7), que resulta em um polímero mais solúvel em água, a quitosana (Hajji *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2022; Kumari; Kishor, 2020).

Figura 7. Esquema reacional da desacetilação da quitina para a obtenção da quitosana.



Fonte: Adaptado de Kumari, S. e Kishor, R (2020). Criado com ChemDraw®

A quitosana (QTS) é um polímero linear, com nome IUPAC β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-desoxi- β -D-glucopiranosose (Lima; Fernandes; Pinto, 2022). Sua estrutura monomérica desacetilada possui uma amina primária e dois grupos hidroxilas com fórmula molecular igual a $C_6H_{11}O_4N$. A amina primária é protonada em meio ácido, tornando o polímero catiônico solúvel em água em condições de baixo pH (Lima; Fernandes; Pinto, 2022; Shivakumar *et al.*, 2021). Essa transição de fase solúvel-insolúvel para a quitosana ocorre em seu valor de pKa em torno de pH entre 6,0-6,5, que está diretamente relacionada com a conversão de unidades de glucosamina na forma solúvel de $R-NH_3^+$, e, portanto, o polímero é solúvel em meios ácidos orgânicos diluídos, como ácido acético, ácido láctico, entre outros (Ardean *et al.*, 2021; Hasan *et al.*, 2022; Kumari; Kishor, 2020).

Normalmente a quitosana é obtida pela desacetilação da quitina em mais de 50% em condições alcalinas. Durante esse processo, pode ocorrer reações de despolimerização além da remoção dos grupos acetil, o que vai influenciar na massa molar do polímero gerado. Tanto o grau de desacetilação quanto a massa molar da quitosana vão influenciar em suas propriedades biológicas e físico-químicas, como toxicidade *in vitro* e solubilidade em água, pois vai determinar se vai haver mais ou menos aminas primárias na estrutura (Hajji *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2022; Lima; Fernandes; Pinto, 2022; Shivakumar *et al.*, 2021).

A quitosana tem atraído bastante a atenção dos pesquisadores na área, pois além de ser um polímero biocompatível e biodegradável, possui propriedades antimicrobianas e mucoadesivas (Shivakumar *et al.*, 2021). Entretanto, a estrutura da

quitosana torna difícil sua solubilidade em água, sem que haja uma mudança forçada de pH. Dessa forma, grupos hidrofílicos podem ser adicionados a ela através de modificações químicas para melhorar essa condição (Tabela 1) e ampliar as aplicações da quitosana (Thao *et al.*, 2021).

Tabela 1. Alguns derivados da quitosana com maior solubilidade em água

Derivado	Atividade	Referência
<i>N,N,N</i> -trimetil quitosana (TMC)	Antibacteriana	(Rufato <i>et al.</i> , 2021; Wu <i>et al.</i> , 2017)
Carboximetil quitosana	Antioxidante Antibacteriana	(Liu <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2021)
<i>N</i> -succinil quitosana	Anticoagulante Antibacteriana Anti-inflamatória	(Chen <i>et al.</i> , 2024; Thao <i>et al.</i> , 2021; Xiong <i>et al.</i> , 2011)
Quitosana sulfatada	Anticoagulante Antibacteriana Antioxidante	(Elkomy; Ali; Eid, 2022; Sahraneshin-Samani <i>et al.</i> , 2022; Vikhoreva <i>et al.</i> , 2005)
Quitosana tiolada	Antibacteriana	(Luo <i>et al.</i> , 2019)

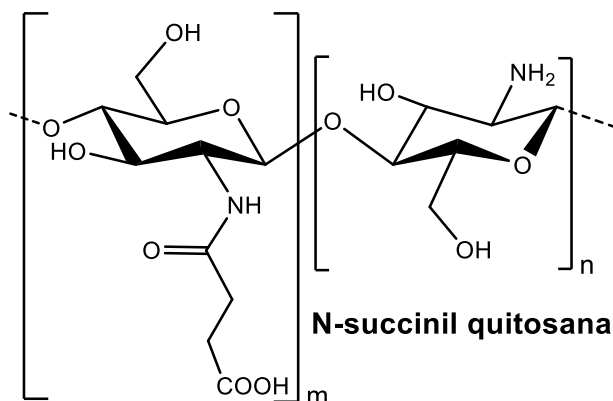
Vários derivados de quitosana mostraram propriedades físico-químicas aprimoradas, além de um aumento na atividade antimicrobiana, como por exemplo a *N*-succinil quitosana que é um polímero solúvel em água biocompatível, obtido através da modificação química da quitosana via reação com anidrido succínico (Lima; Fernandes; Pinto, 2022; Shivakumar *et al.*, 2021).

2.4.1.2 *N*-succinil quitosana (NQTS)

A *N*-succinil quitosana (Figura 8) têm atraído muita atenção dos pesquisadores, pois além de ser solúvel em água em condições brandas e ser biocompatível, também possui baixa toxicidade e sendo utilizada em várias aplicações, como curativo de feridas, liberação de fármacos, carreadores de ativos,

cosméticos, engenharia de tecidos e conservação de alimentos (Elkomy; Ali; Eid, 2022; Niu *et al.*, 2020; Seong; Yun; Park, 2018; Srimai *et al.*, 2024; Xiong *et al.*, 2011).

Figura 8. Representação da estrutura da N-succinil quitosana (NQTS).



Fonte: Adaptado de Niu *et al* (2020). Criado com ChemDraw®.

O trabalho de Xiong *et al.* (2011) observou a presença de atividade coagulante da *N*-succinil quitosana em testes com plasma sanguíneo de coelho. Além da propriedade anticoagulante aumentada, foi visto uma elevada compatibilidade sanguínea, atribuída a maior solubilidade e afinidade do polímero em água.

Thao e colaboradores (2021) fizeram nanopartículas de *N*-succinil quitosana e mostraram sua atividade antibacteriana contra bactérias do tipo gram-positivas e gram-negativas. Além disso, eles fizeram filmes com essas nanopartículas poliméricas e confirmaram sua biocompatibilidade mostrando que esses filmes com NP's de *N*-succinil quitosana encurtaram o tempo de cicatrização de feridas em ratos, sendo um novo material com elevado potencial de regeneração de tecidos.

O estudo de Chen *et al.* (2024) mostrou que a *N*-succinil-quitosana (NQTS) é promissora na reparação de células HUVEC disfuncionais, danificadas por altos níveis de glicose e TNF- α . NQTS promoveu a proliferação celular e a angiogênese, sugerindo seu potencial para acelerar a cicatrização de feridas. Além disso, NQTS demonstrou capacidade de acompanhar a inflamação e restaurar as funções fisiológicas das células lesionadas. Em experimentos com pele de ratos, NQTS melhorou a formação de tecido de granulação, a epitelização e reduziu o tempo de cicatrização em comparação ao controle e à carboximetil-quitosana. Esses resultados sugerem que NQTS tem potencial para aplicações em feridas inflamatórias crônicas, como úlceras diabéticas, podendo ser utilizado em materiais como revestimentos de superfície, compósitos de hidrogel ou esponjas para curativos.

No estudo de Seong *et al* (2018), lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (*egg* PC) foram revestidos alternadamente com quitto-oligossacarídeo (COS) e *N*-succinil-quitosana (NQTS), formando até quatro camadas, resultando em lipossomas com aproximadamente 300–400 nm de espessura. A técnica de automontagem camada por camada (LbL) foi utilizada para criar esses lipossomas multicamadas. A NQTS foi usada como polieletrólito aniônico para o revestimento, enquanto o COS, como um polieletrólito catiônico. Os resultados indicaram que a preparação de lipossomas multicamadas utilizando LbL com COS e NQTS pôde melhorar significativamente a estabilidade dos lipossomas em relação a surfactantes, além de manter uma efetiva liberação de fármacos e permeação cutânea.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas de nanoemulsões com citral revestidas por *N*-succinil quitosana, visando o tratamento tópico de lesões cutâneas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar a NQTS a partir de uma QTS de média massa molar e anidrido succínico;
- Caracterizar os polímeros QTS e NQTS através das técnicas de determinação de massa molar, análise elementar (CHN), espectroscopia no infravermelho (FTIR), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) e ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-RMN}$);
- Desenvolver método para quantificar o citral por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GCMS) junto com a técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME);
- Desenvolver e otimizar nanoemulsões do tipo o/a carreando o ativo citral;
- Realizar o revestimento das nanoemulsões com a quitosana e com a *N*-succinil quitosana para comparação de estabilidade dos sistemas;
- Caracterizar os sistemas coloidais através de técnicas como espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta (ζ), eficiência de encapsulação, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e análise termogravimétrica (TGA);
- Fazer uma avaliação de estabilidade dos sistemas através de estudo de estabilidade acelerada com *Lumisizer* e também um acompanhamento das formulações em temperatura ambiente;
- Avaliar citotoxicidade das formulações por microdiluição em placas de 96 poços
- Realizar testes microbiológicos *in vitro* das formulações obtidas contra cepas de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, no intuito de determinar a concentração inibitória mínima através do método de microdiluição.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

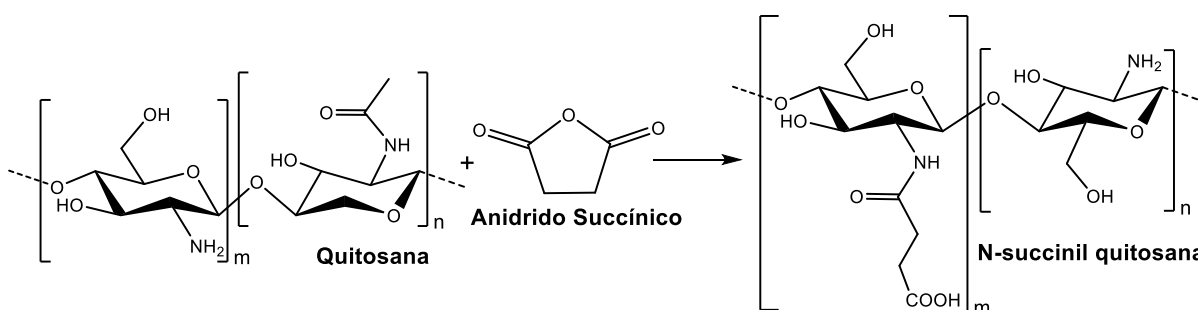
Foram utilizados Quitosana de média massa molar da Sigma Aldrich (massa molar média $M_v = 14.5 \times 10^4$ determinada pelo método viscosimétrico descrito por Witt et al., (2010) e um grau de desacetilação de 88,7% baseando-se no método descrito por Brugnerotto et al., (2001) (Apêndice A)), anidrido succínico e ácido succínico (Sigma Aldrich), acetona, metanol e NaOH (Neon), água deionizada. As NEs foram preparadas utilizando lecitina (*Lipoid*® S75 com 75 % de PC adquirido da *Lipoid GmbH* (Alemanha)), *Pluronic*® P123 (P123) (Sigma Aldrich), óleo de abacate e óleo de oliva adquirido na farmácia Similibus (Florianópolis), citral com 95% de pureza (Sigma Aldrich). Todo e qualquer outro solvente utilizado neste trabalho foi de grau analítico.

4.2 MÉTODOS DE PREPARO

4.2.1 Síntese da N-Succinil Quitosana

A Figura 9 mostra o esquema reacional para a modificação química da quitosana, que foi conduzida conforme a metodologia descrita por Thao et al. (2021) com algumas modificações.

Figura 9. Esquema reacional da modificação química da quitosana com anidrido succínico.



Fonte: Adaptado de Niu et al (2020). Criado com ChemDraw®.

Foi preparada uma solução de quitosana 2,5% (m/v) em ácido acético 3% (v/v) sob agitação de 24h e posteriormente filtrada a vácuo com peneira de 125 μm para

remoção de resíduos de quitina. 20 mL desta solução concentrada de QTS foram lentamente misturados com 5 g de anidrido succínico através de gotejamento em um balão. O sistema foi mantido em agitação mecânica por aproximadamente 24h. Após esta etapa, o pH foi ajustado para 6-7 com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ até a formação de um precipitado branco. O precipitado foi então filtrado a vácuo com uma peneira de 125 µm e lavado com etanol.

Após a etapa de obtenção do precipitado, este foi dissolvido em água e o pH da solução foi ajustado entre 10 a 12 para garantir que não houvesse qualquer resíduo de ácido succínico restante da síntese. Posteriormente foi realizado o processo de diálise em água, para remoção de supostas impurezas residuais da reação. Durante o tempo de diálise foram realizadas medidas de pH a fim de realizar as trocas do meio externo (água) até que este atingisse valores de pH em torno de 5,5. O conteúdo final no saco de diálise foi colocado em um balão de fundo redondo e liofilizado, obtendo assim um sólido branco que foi armazenado em dessecador para posterior caracterização e utilização na etapa de revestimento das nanoemulsões.

4.2.2 Elaboração das nanoemulsões (NEs) com citral

As nanoemulsões foram preparadas através da emulsificação espontânea adaptando a metodologia de Bouchemal *et al.* (2004) com base em estudo desenvolvidos no grupo (Gambin, 2023; Saatkamp, 2019). Com base neste método, a obtenção da emulsão o/a é baseada em duas fases (Tabela 2): ii) a fase orgânica (FO) composta por óleo vegetal, onde o ativo citral foi previamente solubilizado, um surfactante lipofílico, que foi lecitina, e um solvente miscível com água, que nesse caso foi acetona; e II) a fase aquosa (FA) constituída por água e um surfactante hidrofílico – Pluronic P123. A fase orgânica foi adicionada na fase aquosa sob agitação magnética durante 20 minutos para permitir que o sistema entrasse em equilíbrio, formando espontaneamente a nanoemulsão. Após isso, o sistema foi rotaevaporado para a remoção da acetona do meio e avolumado para 40 mL ao final do processo. As nanoemulsões foram armazenadas em temperatura ambiente e refrigerada (4°C), tanto para os testes de estabilidade e demais caracterizações.

Tabela 2. Formulação base utilizada para as NEs.

Fase	Quantidade	Componente
Oleosa (FO)	100 mg	Óleo vegetal + Citral
	20 mL	Lecitina (0,6 g L ⁻¹ em acetona)
Aquosa (FA)	40 mL	P123 (1 g L ⁻¹ em água)

Durante o estudo, foram desenvolvidas nanoemulsões utilizando óleo de abacate e óleo de oliva, com o objetivo de selecionar a formulação que apresentasse o menor Índice de Polidispersidade (PDI), já que, quanto menor este valor maior a monodispersidade do sistema, e quanto mais monodispersa a nanoemulsão, maior sua estabilidade. Além disso, foi variada a proporção entre citral e óleo de abacate, visando obter a maior concentração possível do componente ativo no sistema, mantendo um aspecto visual claro e um PDI reduzido. Dessa maneira, a Tabela 3 elucida as formulações desenvolvidas:

Tabela 3. Composições das nanoemulsões preparadas durante o trabalho.

Composição	Sistema nanoemulsionado				
	NEB1	NEB2	NEC1	NEC2	NEC3
Óleo de abacate	100 mg	-	-	50 mg	35 mg
Óleo de oliva	-	100 mg	-	-	-
Lecitina 0,5 g L ⁻¹ em acetona	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Citral	-	-	100 mg	50 mg	65 mg
P ₁₂₃ 1,0 g L ⁻¹	40 mL	40 mL	40 mL	40 mL	40 mL

4.2.3 Recobrimento das NEs com os polímeros QTS e NQTS

O Revestimento das nanoemulsões com *N*-succinil quitosana foi conduzido misturando-se o polímero em diferentes proporções nas nanoemulsões, com soluções 1% (m/v) previamente preparadas de quitosana e *N*-succinil quitosana para comparação. A Tabela 4 representa as quantidades adicionadas em cada uma das formulações preparadas.

Tabela 4. Volume de cada solução utilizada para a confecção das formulações recobertas com QTS e NQTS.

Amostra	Volumes de cada solução (mL)			
	NEB	NEC	QTS (1% m/v)	NQTS (1% m/v)
NEB	5	-	-	-
NEB@QTS	4	-	1	-
NEB@NQTS	4	-	-	1
NEC	-	5	-	-
NEC@QTS	-	4	1	-
NEC@NQTS	-	4	-	1

Após a adição das soluções poliméricas, os sistemas coloidais permaneceram em agitação magnética constante durante aproximadamente 12 h (Saatkamp, 2019). As amostras finais foram caracterizadas e parte destas soluções foram separadas para uma avaliação de estabilidade durante 3 meses em temperatura ambiente, onde foram acompanhados parâmetros como tamanho (nm), PDI e carga superficial das nanopartículas.

4.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.3.1 Caracterização da quitosana e sua modificação

4.3.1.1 Massa molar por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para a obtenção da massa molar por DLS, através do plot de *Debye* é necessário que os solventes sejam previamente filtrados utilizando um sistema de filtração a vácuo com papel filtro de 0,45 μm de tamanho de poro. A quitosana foi solubilizada e posteriormente diluída em uma solução de ácido acético 1% (m/v) e a NQTS foi solubilizada e diluída em água deionizada. As diluições utilizadas variaram entre 0,2 a 1 g L^{-1} . As soluções foram analisadas utilizando um *Zetasizer Nano Series* modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido), operando em 173° e os dados foram tratados utilizando o software da própria fabricante *Zetasizer*, software 7.12, a fim de obter o plot de *Debye*.

4.3.1.2 *Análise estrutural dos polímeros (FTIR e ¹H-RMN)*

A análise estrutural de ambos os polímeros foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando um equipamento *Shimadzu IRPrestige-21* (Kyoto, Japão) pelo método de pastilhas de KBr. As análises foram realizadas na faixa espectral de 4.000–400cm⁻¹, resolução 1cm⁻¹, com um total de 40 aquisições por amostra.

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) foram realizadas em um Espectrômetro *Bruker Varian* 400 MHz (Varian Inova AS 400, Palo Alto, CA, EUA). A quitosana foi solubilizada em uma solução de D₂O/C₂D₂F₃O₂ (80/20 v/v) e deixada sob agitação por 24 h para total solubilização e posteriormente foi acondicionada no tubo de RMN. Já a solubilização da NQTS foi realizada apenas em D₂O. Foram realizadas 10240 aquisições para cada polímero.

4.3.1.3 *Avaliação das propriedades térmicas (DSC e TGA)*

Avaliação das propriedades térmicas através de calorimetria de varredura diferencial (DSC), utilizando um calorímetro diferencial de varredura modelo Q20 marca *TA Instruments*, em atmosfera de nitrogênio 50 mL min⁻¹ e célula de alumínio, com uma programação da análise, onde o primeiro aquecimento foi de 25 a 110°C para eliminar água, depois houve um resfriamento de 110 a 25 °C, e por fim o segundo aquecimento de 25 a 260 °C, sendo todas estas etapas a uma taxa de 10 °C min⁻¹.

As análises termogravimétricas (TG) foram realizadas em um TGA-50 *Shimadzu* (Kyoto, Japão). Para as análises, 5-10 mg de amostra foram inicialmente colocados em uma panela de platina e aquecidos de 25 a 600 °C (10 °C min⁻¹) sob atmosfera inerte de nitrogênio (50 mL min⁻¹).

4.3.1.4 *Obtenção do grau de modificação química (análise elementar CHN)*

A análise elementar para determinação de teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio, foi feita utilizando um Analisador elementar CHNS/O da marca *PerkinElmer* modelo 2400 Séries II. A partir dos dados obtidos é possível calcular o grau de substituição na quitosana modificada fazendo uma razão entre as porcentagens de C e N de ambos os polímeros e dividindo pelo número adicionado de carbonos por

monômero (Mobarak et al., 2013). Com a adição do anidrido succínico, a NQTS fica com 4 carbonos a mais na estrutura monomérica, portanto a equação 1 elucida como pode ser calculado o grau de substituição neste caso.

Equação 1. Cálculo do grau de substituição na síntese da N-succinil quitosana

$$GS = \frac{(C/N)_{NQTS} - (C/N)_{QTS}}{4}$$

4.3.1.5 *Ensaio de solubilidade com influência do pH na NQTS*

Com o objetivo de compreender melhor o comportamento da NQTS em solução, em diferentes valores de pH (Xiong *et al.*, 2011), foi realizada uma titulação potenciométrica utilizando um pHmetro de bancada modelo W3B (Bel engineering). Foi preparada uma solução de NQTS (1g L⁻¹) em ácido acético (1%) a fim de iniciar a titulação em pH = 2,0. Em seguida a solução foi titulada com uma solução de NaOH (0,1mol L⁻¹). A titulação foi conduzida aferindo o pH a cada 1,5 mL de base adicionados até atingir um pH próximo 12,0.

4.3.2 **Caracterização físico-química dos sistemas coloidais**

4.3.2.1 *Análise do tamanho, PDI e potencial zeta (ζ)*

O tamanho médio de partícula, a distribuição de tamanho, o índice de polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando um *Zetasizer Nano Series* modelo SZ (*Malvern Instruments*, Reino Unido), operando em 173°. O potencial zeta foi avaliado por anemometria laser-doppler usando o mesmo equipamento, operando em 4,0 mW utilizando uma célula eletroforética onde estabeleceu-se um potencial de ±150 mV. Para estas análises não foi realizado nenhuma diluição das amostras e forma analisadas em triplicata. Estes dados foram necessários para o acompanhamento do estudo de estabilidade dos sistemas.

4.3.2.2 *Análise da morfologia pré e pós revestimento*

4.3.2.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As nanoemulsões antes e após o recobrimento tiveram sua morfologia determinada através de microscopia eletrônica de transmissão que foi realizada utilizando um microscópio JEM 1011 operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV, disponível no laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). As amostras foram depositadas em grades de cobre revestidas com filme polimérico (FORMVAR®) e contrastadas pela adição de acetato de uranila 3% (m/v). O excesso de líquido foi removido com papel filtro e deixado secar à temperatura ambiente.

4.3.2.2.2 Microscopia de força atômica (AFM)

Também foi avaliada morfologia dos sistemas através da técnica de microscopia de força atômica (AFM) com o apoio da professora Marta Elisa Rosso Dotto, por um microscópio de força atômica *Nanosurf FlexAFM* – Contato intermitente, ponta modelo TAP190AI-G com frequência de varredura de 1Hz, disponível no laboratório LOOSA - UFSC, onde foram feitas áreas de varreduras de 95, 30 e 10 μm . As amostras foram depositadas em lamínulas de vidro com o excesso de líquido sendo retirado com papel filtro e deixadas secar à temperatura ambiente.

4.3.2.3 *Quantificação do citral*

O teor de citral foi determinado através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas utilizando o método de extração sensível a compostos voláteis, a microextração em fase sólida por *headspace*. O HS-SPME é um método rápido, sensível, econômico e sem uso de solventes para a extração de analitos de diversas matrizes. Nesse processo, os analitos são particionados de uma amostra líquida ou gasosa para uma fase estacionária imobilizada (Anexo A). A técnica utiliza uma configuração simples e não exige instrumentação adicional além de um cromatógrafo a gás (GC) convencional (Lancioni *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2022).

4.3.2.3.1 Análise por GC-MS

A análise de GC foi realizada em um cromatógrafo *Shimadzu* (QP2020NX) utilizando uma coluna capilar como fase estacionária composta por dimetilsiloxano/fenil 95:5 da *Shimadzu*, modelo SH-Rtx-5MS (30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm filme). Como fase móvel, foi utilizado gás hélio (He) com uma vazão de 1 mL min⁻¹. A programação da corrida foi baseada no estudo de Rauber; Guterres; Schapoval, (2005) com algumas modificações.

A temperatura do injetor foi mantida em 250°C, e a rampa de temperatura do forno foi ajustada aquecendo inicialmente de 60°C a 150°C a uma taxa de 5°C/min, e em seguida até 280°C a uma taxa de 30°Cmin⁻¹, sendo mantida por 5 minutos para limpeza térmica. Após essa etapa, o detector de massas quadrupolo da *Shimadzu* foi configurado com uma temperatura da fonte de íons de 230°C e temperatura de interface de 310°C, operando em modo varredura na faixa de 25 a 300 m/z. Com esses parâmetros, o tempo total da corrida foi de 22 minutos.

Entretanto, ao final do trabalho, a corrida foi otimizada novamente na parte da rampa de temperatura do forno, resultando em um tempo total de 19 minutos

4.3.2.3.2 Procedimento de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME)

Um suporte SPME da Supelco Inc. (Sigma-Aldrich) foi usado para realizar manualmente todos os experimentos SPME do *headspace*. A fibra utilizada foi a de PDMS (100 µm), polidimetilsiloxano, da Supelco Inc. O procedimento foi baseado na metodologia de (Tian et al, 2013), com algumas modificações. Primeiramente a fibra foi condicionada no tempo e temperatura recomendados antes do uso de acordo com as instruções do fornecedor para remover possíveis contaminantes. Após isso foi feito a corrida do branco da fibra. Então as amostras foram preparadas adicionado 1 ml da emulsão (diluída se necessário) a um frasco de *headspace* de 20 ml selado com um septo de politetrafluoroetileno e a agitação foi aplicada consistentemente para todas as amostras durante a experiência. Todos os frascos foram equilibrados por 10 minutos antes da extração, e o tempo de amostragem foi variado de 5 a 20 min para otimização. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente (aprox.

23°C). Após cada processo de extração, a fibra foi inserida imediatamente na porta de injeção do GC e a corrida foi iniciada.

4.3.2.3.3 Construção e validação da curva de calibração

Uma nanoemulsão branca (nas mesmas condições feitas da NEC3) foi preparada previamente para a curva de calibração. Massas de 4,3, 6,0; 7,9; e 9,3 mg de citral foram avolumadas com a nanoemulsão em balões de 25 mL, seguido de uma agitação vigorosa, de forma que as concentrações finais obtidas foram 172, 240, 316 e 372 mg L⁻¹, respectivamente. Cada solução passou por uma triplicata do procedimento de HS-SPME, e posteriormente analisada no GC-MS.

A validação analítica seguiu as diretrizes da FDA (Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018), onde foram avaliados parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade e LOD/LOQ.

A seletividade foi avaliada realizando o mesmo procedimento de equilíbrio e extração para uma amostra de nanoemulsão em branco e uma nanoemulsão contendo citral. Isso demonstrou que a fibra é seletiva apenas para compostos voláteis. A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD) para as triplicatas dos pontos da curva de calibração. Se o RSD for inferior a 20%, os pontos são considerados consistentes. A exatidão foi se forma similar à precisão, utilizando triplicata de pontos na faixa de concentração da curva de calibração para determinar as concentrações pela equação da reta e calculando o erro relativo entre os valores teóricos e experimentais. A linearidade foi analisada pela relação entre as concentrações e a resposta analítica do equipamento, observando se os pontos seguem uma tendência linear. Quanto mais próximo o coeficiente de correlação (R^2) estiver de 1, melhor será a linearidade da curva. O limite de detecção (LOD) foi avaliado através de uma relação matemática entre o desvio padrão do intercepto da curva e a inclinação (*slope*). Por fim, o limite de quantificação (LOQ) foi considerado como o ponto de menor concentração da curva que ainda apresentava um RSD inferior a 20%, que neste caso, corresponde ao primeiro ponto da curva (Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018; Stickle, [s. d.]).

4.3.2.4 *Estudo de estabilidade dos sistemas coloidais (LUMISizer®)*

A estabilidade física baseada no comportamento de separação de fases foi avaliada utilizando o equipamento *LUMISizer®* (LUM. GmbH, Berlim, Alemanha) disponível no LINDEN - Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas na UFSC, que utiliza força centrífuga para acelerar a ocorrência de fenômenos de instabilidade como sedimentação, floculação e formação de creme. A técnica mede a intensidade da luz transmitida em função do tempo e da posição ao longo de todo o comprimento da amostra em uma cubeta durante a centrifugação (Dammak; Sobral, 2021; Port, 2023; Wanyi *et al.*, 2020). Para esta análise, as NEs foram colocadas em cubetas retangulares de policarbonato (caminho óptico de 2,0 mm) e centrifugados a 4.000 rpm (2.226 xg) a 25°C e 37°C para capturar 300 perfis de transmissão em um intervalo de 250s (tempo total = 20,8 h). O índice de instabilidade, fator calculado pelo software do equipamento *SEPView®*, foi utilizado para comparar a estabilidade dos NEs. O valor “0” indica nenhuma separação ou alteração na transmissão de luz enquanto “1” representa uma segregação completa de fases.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 **Teste de citotoxicidade**

Para avaliação da toxicidade das formulações, com o apoio do Laboratório LabCancer – Laboratório de farmacologia do câncer, foram utilizadas células da linhagem HEK293 (células embrionárias renais humanas), já que essa linhagem também foi considerada como células epiteliais embrionárias renais (Stepanenko; Dmitrenko, 2015), e neste estudo foi utilizada para comparar com células epiteliais (fibroblastos). Inicialmente essas células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular em meio DMEM com adição de 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após expandir as células, foram semeadas em duas microplacas de 96 poços 5000 células por poço em 100 µL de DMEM. Após 24h de cultivo em microplaca, foram realizados os tratamentos. A formulação final NEC@NQTS (Nanoemulsão com citral revestida com N-succinil quitosana) foi testada nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µmol L⁻¹ (concentração final de citral

no meio) e seus respectivos controles nanoemulsão branca (NEB), nanoemulsão com citral (NEC), nanoemulsão branca revestida com NQTS (NEB@NQTS), e solução de NQTS 0,2% (m/v) e solução de citral 300 mg L⁻¹ em quantidades equivalentes às diluições da NEC@NQTS de 50, 250 e 1000 µmol L⁻¹. Uma das placas foi fixada 24h após o tratamento e a outra após 48h; a fixação foi realizada incubando as placas por 45min com ácido tricloroacético a 10%. Após fixação e secagem das placas, foi realizada a adição de 100 µL de sulforodamina B por poço e incubadas as placas por 30 min em temperatura ambiente (Vichai; Kirtikara, 2006). Após a coloração foi adicionado 200 µL de Tris mmol L⁻¹ em cada poço e as placas posicionadas em um agitador para diluição do corante; em seguida as placas foram lidas em espectrofotômetro (TECAN infinite M200) a 510nm. Os resultados foram expressos em porcentagem da densidade celular em relação ao controle não tratado.

4.4.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das formulações foi realizada pela professora Giovanna Bazzo com o apoio do LabCQ – laboratório de controle de fármacos e medicamentos.

4.4.2.1 Reativação das Cepas

Foram empregadas cepas-padrão dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), obtidas da *Microbiologics*® (Minnessota, USA). As culturas bacterianas mantidas em estoque foram repicadas para placas de Petri contendo Ágar TSA e incubadas durante 24 h a 37 °C, para verificar a viabilidade dos micro-organismos e a pureza das cepas. Em seguida, uma colônia de cada meio foi transferida para Caldo Müller-Hinton (MH), seguido de incubação durante 24 h a 37 °C. A concentração de cada inóculo foi ajustada com salina estéril, tendo como base o tubo 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a 1,5 x 10⁸ UFC/mL. Em seguida, 1 mL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 9 mL de salina estéril, resultando em uma suspensão com aproximadamente 1,5 x 10⁷ UFC/mL, a qual foi empregada nos ensaios posteriores.

4.4.2.2 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) através do método de microdiluição*

Para determinação da MIC, foram utilizadas as formulações finais com citral e os controles, NEB, NEB@NQTS e solução polimérica NQTS 0,2%. No caso do citral, preparou-se uma solução na concentração de 2000 mg L⁻¹, empregando solução salina acrescida de 0,05% (v/v) de *Tween* 80 como diluente. A partir das amostras iniciais, foram preparadas diluições seriadas, empregando um fator de diluição de 2, nos próprios poços da placa de microdiluição, utilizando solução salina estéril como diluente. Em seguida, adicionou-se, a cada poço da microplaca contendo 100 µL de cada diluição, 80 µL de Caldo MH e 20 µL da suspensão de cada micro-organismo. Os ensaios foram realizados em duplicata. Controles de esterilidade do meio de cultivo e do diluente foram conduzidos em cada ensaio, assim como controles de crescimento bacteriano e de ausência de contaminação nas amostras. As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C e o crescimento bacteriano evidenciado através de turvação e pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 2 h, à mesma temperatura. Poços com crescimento celular adquirem a coloração rosa, enquanto os poços sem crescimento permanecem incolores. A MIC foi determinada como a menor concentração da diluição da amostra que inibiu o crescimento microbiano (Enumo *et al.*, 2020; Waisczik, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA N-SUCCINIL QUITOSANA

5.1.1 Determinação da massa molar

A intensidade da luz espalhada por uma macromolécula é proporcional ao produto entre o peso molecular médio ponderado e a concentração da macromolécula. Para moléculas cuja dispersão da luz não depende do ângulo, essa relação é descrita pela equação de *Rayleigh* (Molecular Weight by Single Angle Debye Plot Method | Malvern Panalytical, [s. d.]).

Equação 2. Equação de *Rayleigh* para determinação da massa molar de macromoléculas.

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2C\right)$$

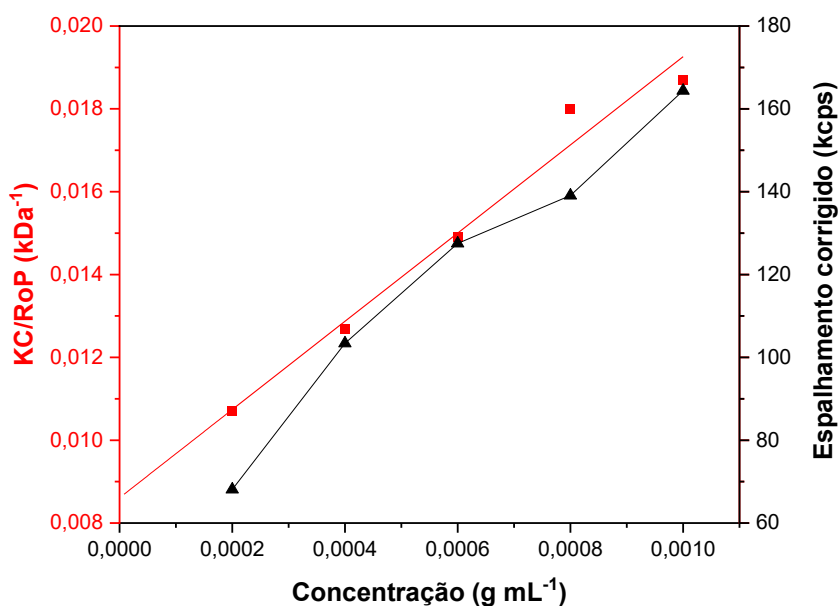
Onde K é uma constante óptica, R_{θ} é a razão de *Rayleigh* entre a intensidade da luz espalhada e a luz incidente, M é o peso molecular médio ponderado, A_2 é o segundo coeficiente virial, e C é a concentração da amostra. Dessa forma, espera-se que um gráfico de KC/R_{θ} versus C seja linear, com a interceptação no eixo equivalente a $1/M$ e a inclinação correspondente ao segundo coeficiente virial A_2 . Esse gráfico é conhecido como gráfico de *Debye* (Molecular Weight by Single Angle Debye Plot Method | Malvern Panalytical, [s. d.]).

O polímero puro (QTS) e o sintetizado (NQTS) foram caracterizados através da sua massa molar por espalhamento de luz a partir do plot de *Debye*, a fim de avaliar alterações nas propriedades físico-químicas do novo material formado. Após a medição do espalhamento de luz das soluções, foram obtidos os valores de espalhamento corrigido (K_{cps}) e $KC/R_{\theta P}$, mostrados na Tabela 5:

Tabela 5. Dados obtidos para determinação da massa molar da NQTS.

Concentração (g mL ⁻¹)	Espalhamento corrigido (kcps)	KC/RoP (kDa ⁻¹)
2,00e-4	68,1	0,0107
4,00e-4	103,4	0,0127
6,00e-4	127,5	0,0149
8,00e-4	139,1	0,0180
0,00100	164,4	0,0187

A partir dos dados medidos pelo equipamento o próprio software gerou automaticamente o gráfico de *Debye Plot* (Figura 10), onde o ajuste linear da concentração pelo KC/RoP possibilita a determinação da massa molar dos polímeros através da equação linear da reta (Equação 3).

Figura 10. *Debye Plot* para determinação da massa molar da NQTS

Equação 3. Ajuste linear do gráfico de *Debye* para a NQTS.

$$y = 10,65x + 0,00861$$

Onde foi possível obter uma linearidade (R^2) de 0,9761. Conforme a equação de *Rayleigh* (Equação 2), o inverso do coeficiente linear deu o valor da massa molar do polímero analisado. Os dados obtidos estão reunidos na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6. Dados de massa molar obtidos para a quitosana e a modificada.

Polímero	Massa molar / kDa	A_2 / mL mol g ⁻²
QTS	261 ± 65	0,0568 ± 0,0103
NQTS	116 ± 8	0,00535 ± 4,92e ⁻⁴

Houve uma perda de massa após a modificação química, onde provavelmente parte do polímero pode ter hidrolisado na etapa de ajuste de pH até 10-12. Entretanto, essa etapa foi necessária para retirar o excesso de ácido succínico resultante na síntese, já que ele é um agente reticulante para a quitosana e seus derivados, e o objetivo do trabalho era melhorar a solubilidade do polímero. De fato, se não ocorre a etapa de ajuste para pH básico, a reticulação acontece, pois na primeira tentativa de síntese foi evitado este processo, resultando em um polímero insolúvel em meio aquoso, ácido, neutro e básico.

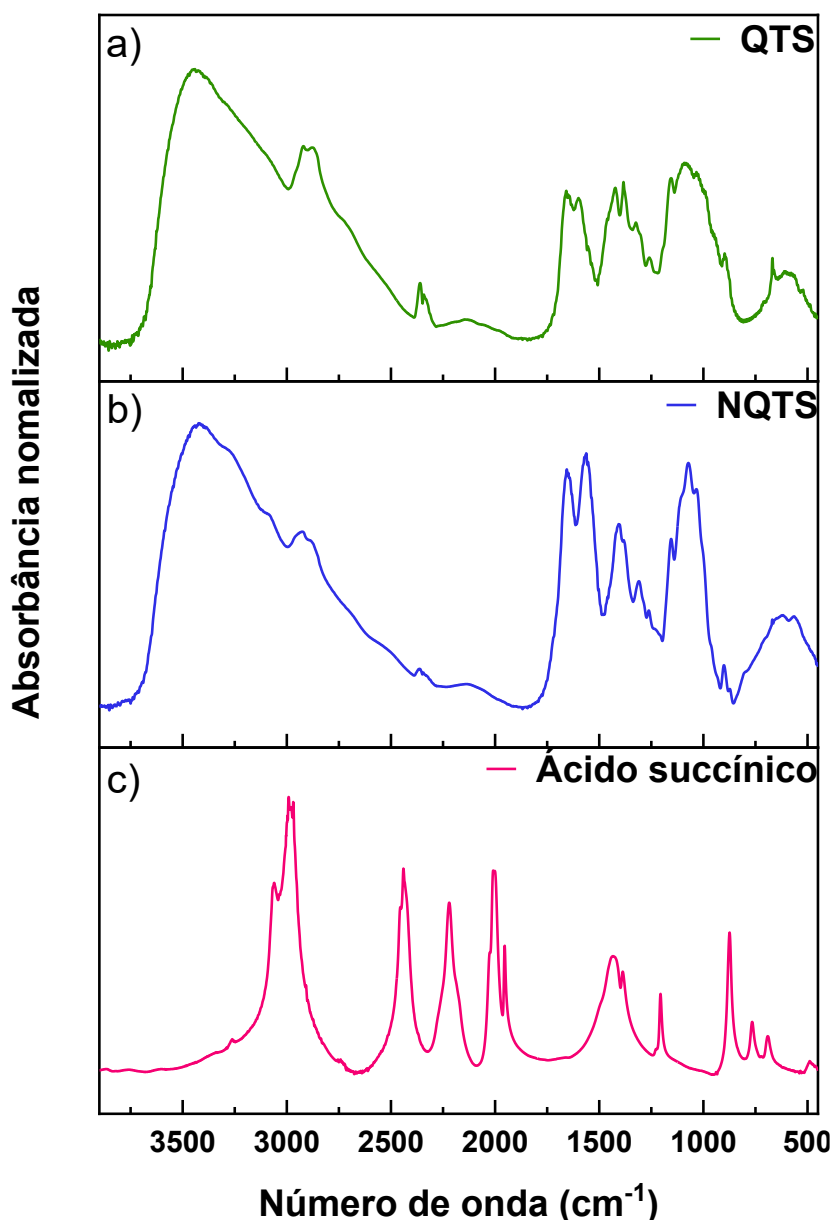
A massa molar da quitosana teve um erro maior, possivelmente devido a sua dificuldade em solubilizá-la em meio aquoso e ainda possuir resquícios de quitina no meio. Entretanto, um ensaio de viscosidade utilizando um viscosímetro de *Ostwald* onde a massa molar viscosimétrica média foi determinada pela equação de *Mark-Howink-Sakurada* (Apêndice A), e o resultado obtido foi de massa molar viscosimétrica média de 145, sendo considerada média massa molar, o que corrobora com o resultado obtido por DLS e também com a especificação da Fabricante.

Já o segundo coeficiente virial é uma propriedade que descreve a força de interação entre a molécula e o solvente. Para amostras onde $A_2 > 0$, as moléculas tendem a permanecer em solução. Quando $A_2 = 0$, a força de interação molécula-solvente é equivalente à força de interação molécula-molécula e o solvente é descrito como sendo um solvente *theta*. Quando $A_2 < 0$, as moléculas tendem a cristalizar ou agregar (Molecular Weight by Single Angle Debye Plot Method | Malvern Panalytical, [s. d.]). No caso da QTS e da NQTS, ambas tiveram valores positivos de A_2 indicando que a energia de interação entre cada polímero e água (com ácido acético no caso da quitosana) é mais forte que a energia de interação entre os polímeros com eles mesmos.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização estrutural do polímero e da modificação obtida, foi realizada por meio de espectroscopia do infravermelho (FTIR) como apresentado abaixo na Figura 11.

Figura 11. Espectros de infravermelho: a) QTS, b) NQTS e c) ácido succínico.



A modificação química da quitosana pôde ser evidenciada com o aparecimento de uma banda característica de $\nu\text{C}=\text{O}$ de amida em 1655 cm^{-1} e uma banda em 1561 cm^{-1} característica de νCOOH (Figura11b). Além disso, no espectro

da NQTS houve o aparecimento de uma banda em 1407 cm^{-1} que está associada a íons νCOO^- (Bashir *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2020; Thao *et al.*, 2021). É possível notar que a quitosana também possui uma banda característica de $\nu\text{C=O}$ de amida em 1654 cm^{-1} , porém em menor intensidade, pois essa banda é referente ao grupo amida proveniente da quitina antes de ser modificada.

Comparando os dois espectros, também houve um deslocamento na banda referente ao estiramento grupo νOH , onde no perfil espectral da quitosana aparece em 3451 cm^{-1} , e para a *N*-succinil quitosana aparece em 3422 cm^{-1} . No espectro da NQTS aparece um pico sutil (provavelmente mascarado pela intensidade do grupo OH) em 3081 cm^{-1} que indica a que foi feita uma acilação em NH_2 (Bashir *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2020; Thao *et al.*, 2021).

A partir disso, é possível dizer que houve modificação do tipo acilação e que possivelmente ocorreu na porção nitrogenada, já que os picos característicos de estiramento de hidroxilas primárias e secundárias se mantiveram em ambos os espectros, com valores de 1083 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} para a QTS e 1072 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} para a NQTS, indicando que não houve participação das hidroxilas na modificação (Niu *et al.*, 2020).

5.1.3 Análise de ressonância nuclear magnética de próton (^1H -RMN) para os polímeros

Para melhor caracterizar a modificação química da quitosana, foi realizado estudo de ^1H RMN para se obter a comparação do polímero puro e do polímero modificado. Nas Figuras 12 são apresentados os espectros de ^1H RMN para a quitosana e para a *N*-succinil quitosana, respectivamente.

Pode-se observar na figura, que tanto para a QTS quanto para a NQTS, em 4,96 ppm há presença de solvente (água) residual deslocado, devido a adição do ácido trifluoacético deuterado como solvente (Fulmer *et al.*, 2010). O sinal da amina em ambos os espectros é sobreposto pelo pico do solvente. Nos dois polímeros, os hidrogênios H 2', 3', 4 e 4', 5 e 5', 6 e 6' estão no multipeto localizado na faixa de 3,4 a 2,6 ppm. Em 1,33 ppm encontra-se o hidrogênio 7' referente a fração acetilada para a QTS, e em 1,28 ppm para a NQTS. O H 1' referente ao carbono anomérico está localizado em 4,08 ppm para a QTS e em 4,14 ppm para a NQTS. O hidrogênio 1

referente ao outro carbono anomérico ficou sobreposto pelo pico de solvente em ambos os espectros. O hidrogênio 3 aparece em 3,80 ppm para a quitosana e em 3,84 ppm para a modificada. Já o hidrogênio 2 surge em 2,39 ppm para a QTS e em 2,42 ppm para a NQTS (Sánchez *et al.*, 2021; Thao *et al.*, 2021). Todos os deslocamentos químicos de hidrogênio estão melhores elucidados na Tabela 7.

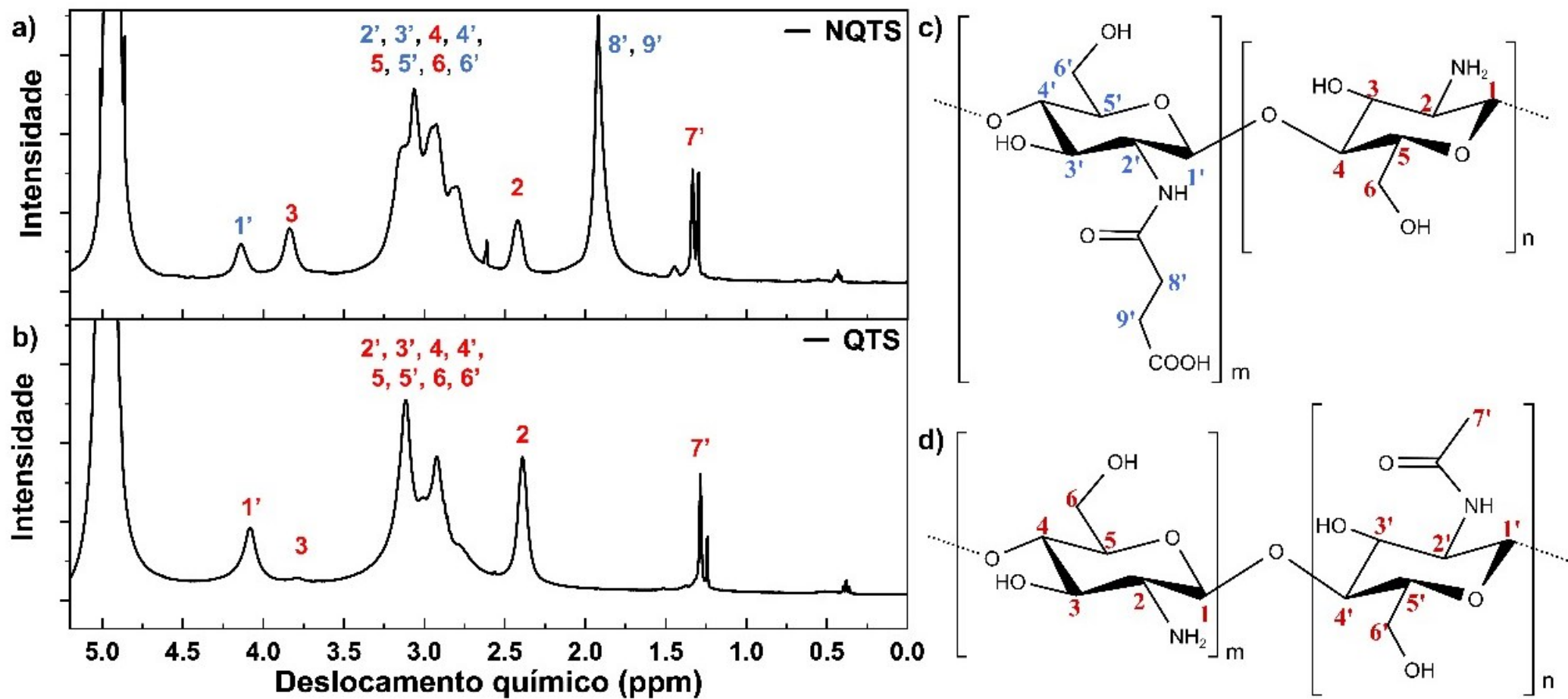
Tabela 7. Atribuições dos deslocamentos nos espectros de ^1H com os respectivos hidrogênios em cada polímero

Posição	Descrição do Hidrogênio	δ (ppm) QTS	δ (ppm) NQTS	δ (ppm) Ác. Suc.
Solvente	Água residual	4,96	4,96	5,70*
H 2', 3', 4, 4', 5, 5', 6, 6'	Multipletos	3,4 a 2,6	3,4 a 2,6	-
H 7'	Hidrogênio da fração acetilada	1,33	1,28	-
H 1'	Carbono anomérico	4,08	4,14	-
H 1	Outro carbono anomérico	Sobreposto	Sobreposto	-
H 3	Hidrogênio no carbono 3	3,80	3,84	-
H 2	Hidrogênio no carbono 2	2,39	2,42	-
H 8',9'	Metileno oriundos do ácido succínico	-	1,92	-
-CH ₂ -CH ₂ -	Metileno do ácido succínico	-	-	2,69*

*Apêndice B

A principal evidência da modificação química está em um sinal singlete que aparece no espectro da NQTS (que não aparece no espectro da QTS), em 1,92 ppm, referente aos hidrogênios H 8',9' oriundos da inserção do ácido succínico na amina primária do agrupamento do monômero desacetilado da quitosana (Li *et al.*, 2020; Thao *et al.*, 2021). Para comparação com o ácido succínico puro, foi realizada a análise dele utilizando as mesmas condições e solventes usados nos polímeros, onde apareceu um sinal singlete em 2,69 ppm referente aos hidrogênios dos grupos metileno (-CH₂-CH₂-) na estrutura simétrica do ácido, indicando que provavelmente a inserção do grupo succínico na QTS foi realizado com êxito. Esses resultados corroboram com os supracitados no subtópico infravermelho, sendo um mais um forte indício da modificação da quitosana.

Figura 12. Espectros de ^1H RMN de (a) N-succinil quitosana (NQTS) e (b) quitosana (QTS), com as atribuições de hidrogênio de cada estrutura (c) e (d) respectivamente. Solvente: D_2O e $\text{C}_2\text{DF}_3\text{O}_2$ (80/20 v/v).



5.1.4 Avaliação das propriedades térmicas por DSC e TGA

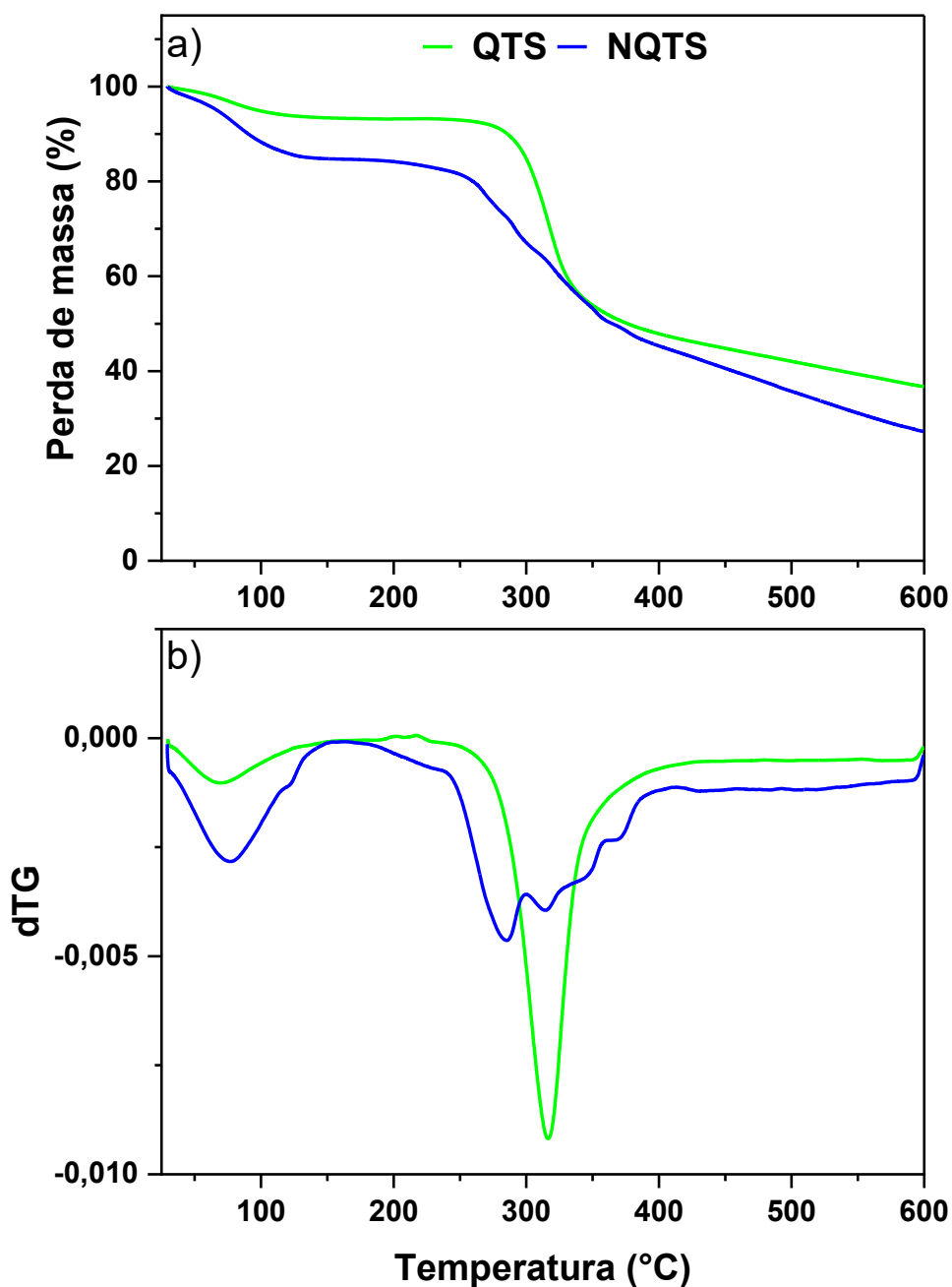
5.1.4.1 *Análise termogravimétrica (TGA)*

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica empregada para avaliar a estabilidade térmica de diversos materiais. O aparelho possui uma balança ultrasensível que mede as mudanças de massa enquanto um forno programável controla o calor da amostra (Ebnesajjad, 2006). A estabilidade térmica da quitosana e do polímero modificado foi avaliada pela técnica descrita acima, de modo que foi avaliado o perfil de degradação de ambos e a partir do gráfico de perda de massa por temperatura (Figura 13) foi feito o gráfico com a derivada aplicada nos pontos de inflexão, para obter melhor visualização dos resultados.

Analisando qualitativamente (Figura 13) e quantitativamente (Tabela 8), é nítido que os materiais possuem perfis de perda de água e degradação distintos. A curva de perda de massa da QTS (Figura 13 e Tabela 8) mostra dois eventos claros, o primeiro entre 45,6 e 105,3 °C (6,69%) relacionado a perda de água e um evento de degradação na faixa de 295,0 a 336,3 °C (47,4%) (Enumo et al., 2020a)(Bashir et al., 2015). Os eventos térmicos para a NQTS estão relacionados a perda de água entre 45,5 a 114,8 °C (15,2%) e a degradação do polímero com um evento entre 243,4 a 368,4 °C (42,2%), apresentando dois máximos de degradação em 285,2 e 314,6 °C. Na revisão feita por (Bashir et al., 2015) é reportado para a NQTS três eventos térmicos, sendo o primeiro relacionado a saída do solvente e seguidos pela degradação do polímero em duas etapas.

A inserção do ácido succínico a estrutura da quitosana tem como objetivo aumentar a sua solubilidade em água, o que pode ser verificado quando comparamos a perda de água das amostras, já que a NQTS (15,2%) apresentou praticamente o dobro de massa de água que a QTS (6,69%). A comparação do perfil do segundo evento de degradação da quitosana com a NQTS, também é um forte indício da inserção do ácido succínico a estrutura.

Figura 13. Curvas de perda de massa versus a temperatura (a), assim como a derivada primeira da curva de perda de massa (b) para a QTS, NQTS e ácido succínico.



A diminuição da porcentagem residual da NQTS em relação a QTS, é outro indício do sucesso na síntese, já que a massa residual está diretamente ligada a massa inicial de água no processo e a presença do ácido succínico ligado a QTS que é totalmente degradado após 245 °C. As análises de TG também apontam que não temos a presença de ácido succínico não reagido no fim do processo de purificação

do polímero, mostrando a importância do processo de diálise com longos períodos de tempo, como apontado no item 4.2.1.

Tabela 8. Perda de massa em diferentes estágios e percentual de massa residual em cada material.

Amostra	T₁^a	%₁^b	T₂^a	%₂^b	Resíduo^c
QTS	45,6 - 105,3	6,7	295,0 - 336,3	47,4	45,6
NQTS	45,5 - 114,8	15,2	243,4 - 368,4	42,2	42,6
A.S.*	208,0 - 245,0	98,3			0,7

^a Temperatura de início e final de cada evento de perda de massa (°C)

^b Percentual de perda de massa em cada estágio de degradação (%)

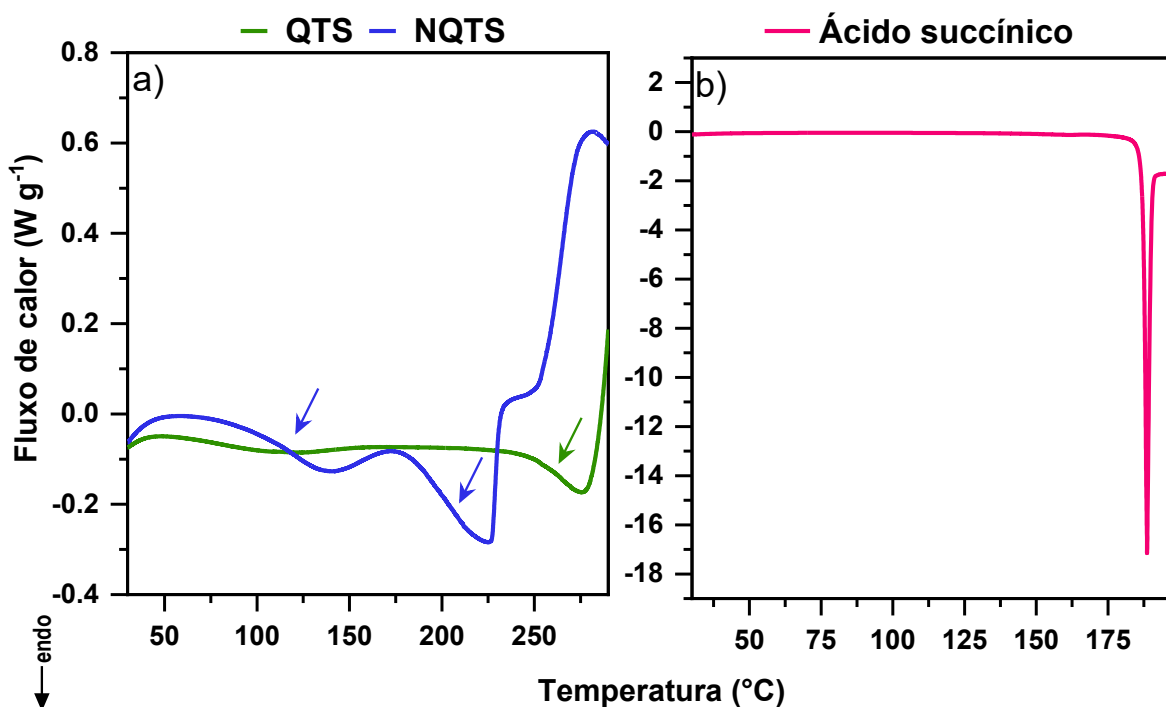
^c Percentual de massa residual.

*Apêndice C

5.1.4.2 *Calorimetria de varredura diferencial (DSC)*

Com o objetivo de caracterizar a modificação da QTS com o ácido succínico, foram realizadas análises de DSC do polímero puro (QTS) do polímero modificado (NQTS) (Figura 14a) e do reagente puro na sua forma ácida (ácido succínico) (Figura 15b). O ácido succínico apresenta apenas um evento de fusão com posterior degradação em 187,4 °C com uma entalpia de fusão de 314,0 J g⁻¹. Estudos realizados por (S. Y. Lin, 2017) e (H. L. Lin et al., 2014) encontraram uma temperatura de fusão de 184 e 191 °C para o ácido succínico puro, respectivamente.

Figura 14. Curvas de calorimetria diferencial de varredura para a quitosana e quitosana modificada (a) e ácido succínico (b).



A curva calorimétrica da quitosana, como já bem reportado na literatura apresenta um evento inicial em torno de 100 °C referente a perda de água e uma transição vítrea (T_g) em 263 °C seguida de degradação como demonstrado nas curvas de TGA (ENUMO et al., 2020). Para a NQTS também são observados dois eventos térmicos, sendo um em 115 °C e outro em 200 °C com posterior degradação (Bashir et al., 2015). Porém neste caso ambos os eventos estão correlacionados a transições vítreas, já que o primeiro evento ocorre após a saída da água, que foi previamente reportada nas análises de TGA entre as temperaturas de 25 e 85 °C. Todos os eventos relatados nas curvas de DSC são transições e não tem correlação com degradação, como observado acima no item 5.1.4.1.

5.1.5 Obtenção do grau de modificação química para a NQTS

Como descrito em 4.3.1.4, é possível obter o grau de modificação química de um polímero através da análise elementar de CHN, onde são obtidas porcentagens de cada elemento que compõe a molécula (Tabela 9). A partir da razão entre as porcentagens de carbono e nitrogênio da quitosana e da N-succinil quitosana, pode-

se utilizar a equação mostrada em 4.3.1.4 para calcular o grau de substituição que ocorre pela amina desacetilada da quitosana, o número de carbonos adicionado por monômero é igual a 4 por conta da estrutura do anidrido succínico. Assim temos que a razão C/N foi maior para a NQTS, o que indica o aumento do número de carbonos por monômero no polissacarídeo, desse modo foi encontrado um grau de substituição de 59%. Então pode-se supor que para esta modificação analisada, existem dois monômeros que compõem a estrutura do polímero, um correspondente a quitosana não modificada com 41% de composição da estrutura, e o outro resultante da modificação química com 59%. Isso indica que em um pH específico o polímero será insolúvel, sendo possível fazer um ensaio para determinar o ponto isoelétrico do mesmo (Xiong *et al.*, 2011).

Tabela 9. Resultados da análise elementar QTS e NQTS.

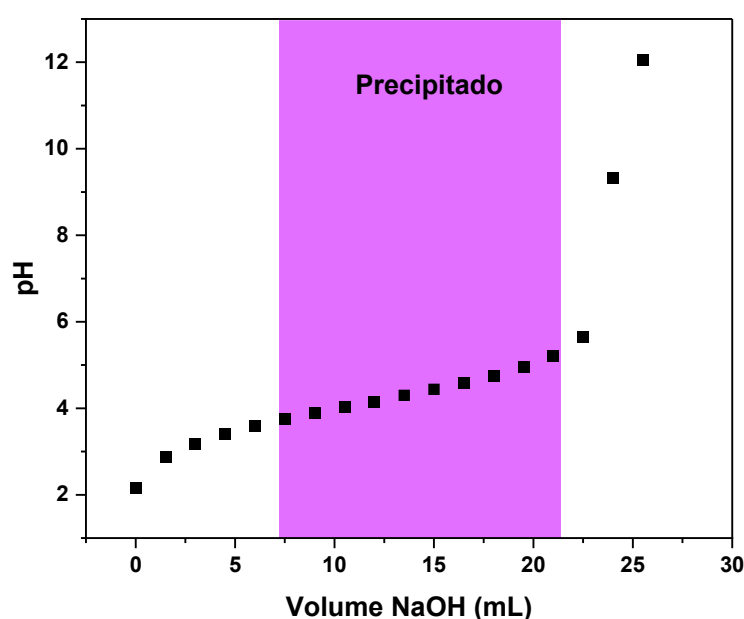
Polímero	% C	% H	% N	C/N	DS
QTS	37,64	7,37	7,01	5,369	-
NQTS	36,87	6,98	4,77	7,730	0,590

5.1.6 Ensaio de solubilidade com influência do pH na NQTS

A partir da titulação feita para avaliar o comportamento do polímero em diferentes pH's, foi construído um gráfico para facilitar a visualização da solubilidade aparente da NQTS (Figura 15). A faixa de pH onde o polímero fica insolúvel, isto é, quando se apresenta na forma *Zwitteriônica*, com quantidade equimolar de cargas positivas (grupo amino protonado) e cargas negativas (grupos carboxilatos), foi avaliada visualmente, de modo que o polímero precipitou em pH igual a 3,76 após a adição de 7,5 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e ressolubilizou em pH igual a 5,2 após a adição de 21 mL do titulante. Esse ensaio é importante para compreender o comportamento da NQTS em solução a diferentes condições, e relacionar isso com o grau de substituição, como foi feito no trabalho de Xiong *et al.*, (2011), que obteve resultados parecidos com uma NQTS com grau de substituição de 0,53. A NQTS nesse trabalho teve grau de substituição igual a 0,59.

Fazendo uma comparação com o trabalho de Toh *et al.*, (2011), onde foi obtida uma NQTS com grau de substituição (DS) de 0,20, foram obtidos valores de pK_{a1} e pK_{a2} , iguais a 2,38 e 6,5 respectivamente. Já no trabalho de Xiong *et al.*, (2011), foi observada uma faixa de pH onde o polímero é insolúvel, de 4,5 até 6,5. Isso mostra uma relação entre o DS e as faixas de pH onde o polímero é insolúvel, quanto maior o DS menor a faixa de pH onde o polímero é precipitado. No caso deste trabalho a faixa foi de pH 3,76 até 5,2.

Figura 15. Ensaio de solubilidade com influência do pH na NQTS

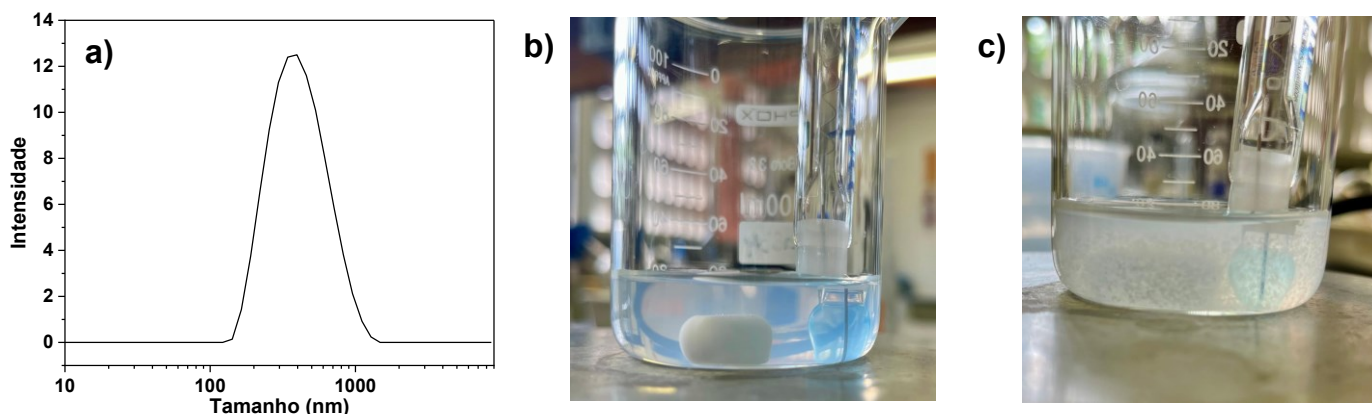


Um ponto antes do polímero precipitar, em pH 3,60, ele se auto agregou, formando nanopartículas, de modo que a solução polimérica adquiriu um aspecto com brilho azulado (comum em sistemas coloidais). Então foi retirada uma alíquota para fazer uma análise de DLS (Figura 16a). Observando a figura de fato, o sistema se autoassociou em pH 3,60 (Figura 16b), de modo que o tamanho médio lido foi 368,4 nm com PDI igual a 0,180 e potencial zeta de 6,12. Porém ao adicionar um pouco mais da solução titulante, o polímero precipitou (Figura 16c). Seria interessante avaliar futuramente esse sistema coloidal e ver se seria estável ao longo do tempo para uma possível aplicação em *drug delivery*.

Essa auto-organização já foi relatada no estudo de Aiping *et al.*, (2006), onde eles atribuem esse mecanismo de autoassociação a interações do tipo ligação de H com a água e a interação hidrofóbica entre as partes hidrofóbicas do polímero, como

-CH₂CH₂, os grupos acetil e os anéis glicosídicos na NQTS. E dentro das nanoesferas, existem os domínios hidrofóbicos formados.

Figura 16. Fenômeno de auto-organização do polímero em NPs. Em a) distribuição de tamanho médio, b) momento em que o sistema ficou com brilho azulado (pH = 3,6) e c) O começo de sua precipitação após adicionar um pouco mais de base.



5.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES E SEU REVESTIMENTO

5.2.1 Condições iniciais para escolha da formulação final

Para a melhor definição dos parâmetros de desenvolvimento dos materiais objeto do estudo, foram desenvolvidas duas nanoemulsões brancas (sem ativo), seguindo a metodologia descrita em 4.2.2, mudando apenas o óleo vegetal presente na fase oleosa, de modo a verificar qual das opções se apresentaria com melhor aspecto e melhor relação entre tamanho e índice de polidispersividade (Figura 17a).

Analisando as duas NEs por espalhamento de luz dinâmico, fica visível que a formulação com óleo de abacate (OA) ficou com maior monodispersidade, além do tamanho ter ficado menor também, indicando que o sistema fica mais estável com o óleo de abacate do que com o de oliva. Em termos de aspecto (Figura 17b), ambas ficaram muito parecidas, entretanto a com óleo de avocado apresentou um brilho azulado, característico de sistemas coloidais (em escala nanométrica) por conta do efeito *Tyndall* (McClements, David J.; Jafari, 2018). A partir dos resultados macroscópicos e os detalhados na Tabela 10, evidencia-se que o óleo de abacate é o que apresenta as melhores características para o desenvolvimento das emulsões, neste estudo.

Figura 17. Resultados das NEs com óleo de abacate (NEB1) e oliva (NEB2). (a) Distribuição de tamanho por DLS, (b) à esquerda formulação com óleo de oliva e à direita com óleo de abacate.

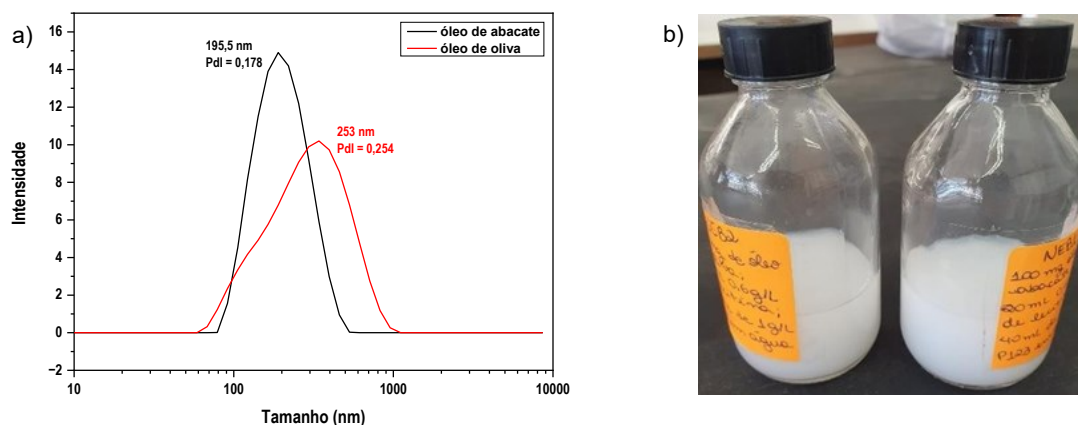


Tabela 10. Resultados DLS¹ para as nanoemulsões brancas

Nanoemulsão	Tamanho (nm)	PDI
NEB1	195,5 ± 1,6	0,165 ± 0,014
NEB2	250,1 ± 3,8	0,245 ± 0,023

Após a escolha do óleo de abacate como fase oleosa para o desenvolvimento de nanoemulsões para encapsulação do citral, foram desenvolvidas 3 formulações, onde uma continha somente citral como fase oleosa (NEC1), e as outras duas tinham proporções citral:OA → 1:1 e 2:1, NEC2 e NEC3 respectivamente. Os valores de tamanho (nm), PDI e potencial zeta estão elucidados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados DLS para nanoemulsões com citral

Nanoemulsão	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)
NEC1	68,46 ± 0,38	0,837 ± 0,006	-28,7 ± 1,33
NEC2	155 ± 1,0	0,117 ± 0,012	-30,3 ± 1,0
NEC3	123 ± 0,3	0,137 ± 0,025	-34,8 ± 0,49

Avaliando os resultados obtidos, a NEC1 foi descartada como formulação por conta de seu valor altíssimo de índice de polidispersão, já que, o ideal é que

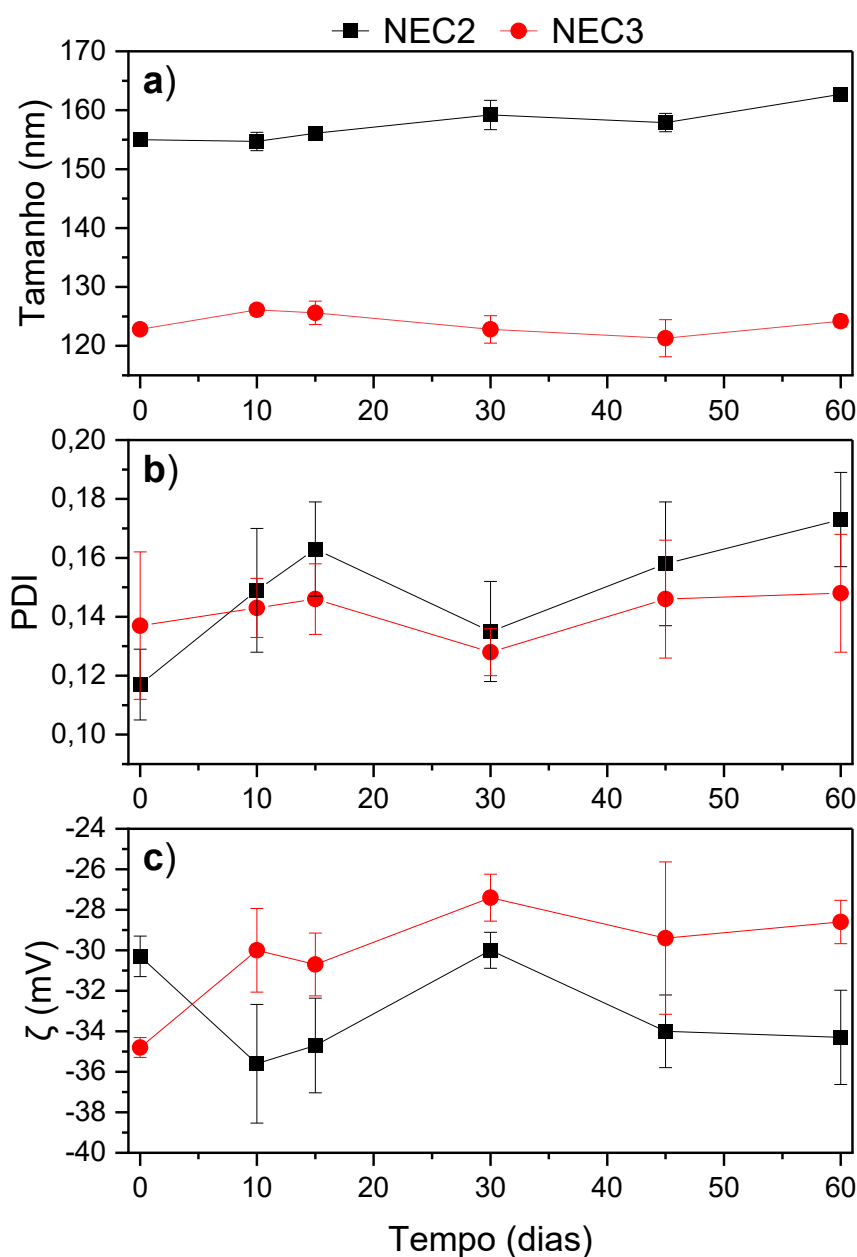
¹ Os desvios apresentados em todas as tabelas similares são referentes a leitura em triplicata feita pelo próprio equipamento *ZetaSizer*®.

nanoemulsões devam ter um valor de PDI abaixo de 0,3 para garantir a monodispersidade do sistema (McClements, David J.; Jafari, 2018). O fato de não ter formado um sistema estável apenas com os surfactantes, pode estar relacionado ao citral ser apenas um monoterpreno, e nas outras nanoemulsões o óleo de abacate (OA) pode ter contribuído para a estabilização das NEs por efeito hidrofóbico, isto é, a composição do OA rica em cadeias longas de ácidos graxos auxiliou no processo de formação da gotícula que depois foi estabilizada pelos surfactantes (McClements, David J.; Jafari, 2018).

Após isso, a questão era escolher entre a NEC2 e a NEC3 para dar continuidade ao trabalho. Ambas tiveram bons resultados em termos de tamanho, PDI e potencial zeta. Em termos de aspecto, a NEC3 se apresentou opticamente mais clara do que a NEC2, e com uma consistência menos viscosa, menos formação de creme nas laterais, o que acabou sendo o critério para seleção final. Mesmo assim, foi feito uma avaliação de estabilidade de prateleira das formulações em temperatura ambiente, para ver se poderia ter alguma mudança nos sistemas (Figura 18).

Os valores negativos de potencial zeta são referentes a lecitina presente no sistema, provenientes do grupo fosfato na acetilcolina que tem a tendência a ficar orientado para “fora” da gotícula da nanoemulsão (McClements, David Julian; Jafari, 2018).

Figura 18. Estudo de estabilidade durante 60 dias comparando NEC2 e NEC3, onde os parâmetros avaliados foram: a) Tamanho (nm), b) PDI e c) potencial zeta.



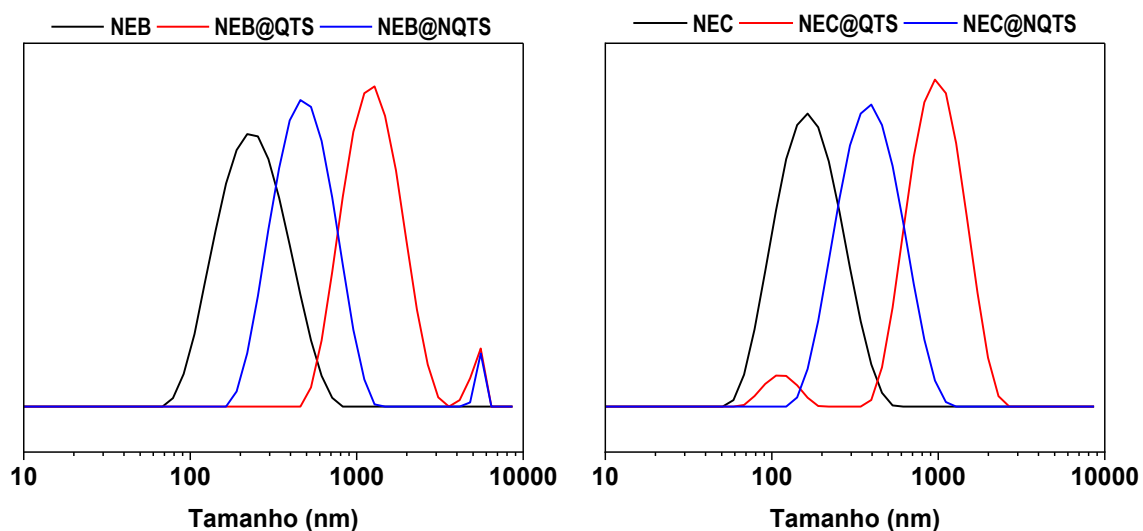
Avaliando os parâmetros de tamanho, PDI e potencial zeta durante 60 dias, a escolha da NEC3 como formulação ideal se confirma. A NEC2 apresentou uma tendência, mesmo que pequena, de coalescer com o tempo. É possível ver que em comparação ao primeiro dia de análise, ela aumentou com o tempo, o PDI aumentou significativamente e o potencial zeta diminuiu. Estas observações, sugerem que provavelmente a nanomeulsão estava sofrendo fenômenos de separação, comuns neste tipo de amostra. A NEC3 talvez por apresentar um tamanho menor, apresenta maior estabilidade cinética, o que explicaria o fato de permanecer praticamente

inalterada durante todo o estudo. Portanto, para a continuidade do estudo com os experimentos de recobrimento, as amostras escolhidas foram NEB1 e NEC3.

5.2.2 Avaliação do tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos sistemas pré e pós revestimento

Após a etapa de recobrimento, as formulações foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmico para verificar se houve mudança nos sistemas (Figura 19, Tabela 12).

Figura 19. Gráficos de distribuição de tamanho de partícula por intensidade.



A partir da figura 19, já é perceptível que houve um deslocamento de tamanho em relação as nanoemulsões puras. Ambos os polímeros apresentaram evidências interessantes sobre a eficácia do revestimento. Pela Tabela 12 fica melhor elucidado os resultados após o recobrimento com os polímeros.

Tabela 12. Resultados DLS para as formulações antes e após o recobrimento

Nanoemulsão	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mV)
NEB	209,3 ± 3	0,228 ± 0,009	-41,3 ± 1,16
NEB@QTS	1062 ± 16,09	0,411 ± 0,032	41,4 ± 1,10
NEB@NQTS	517,3 ± 24,97	0,490 ± 0,012	-19,7 ± 0,56
NEC	149,2 ± 1,38	0,184 ± 0,006	-37,2 ± 1,76
NEC@QTS	686,3 ± 27,82	0,379 ± 0,059	41,9 ± 2,33
NEC@NQTS	315,7 ± 3,81	0,252 ± 0,001	-18,2 ± 0,47

NEB – nanoemulsão branca; NEC – nanoemulsão com citral; QTS – quitosana, NQTS – N-succinil quitosana

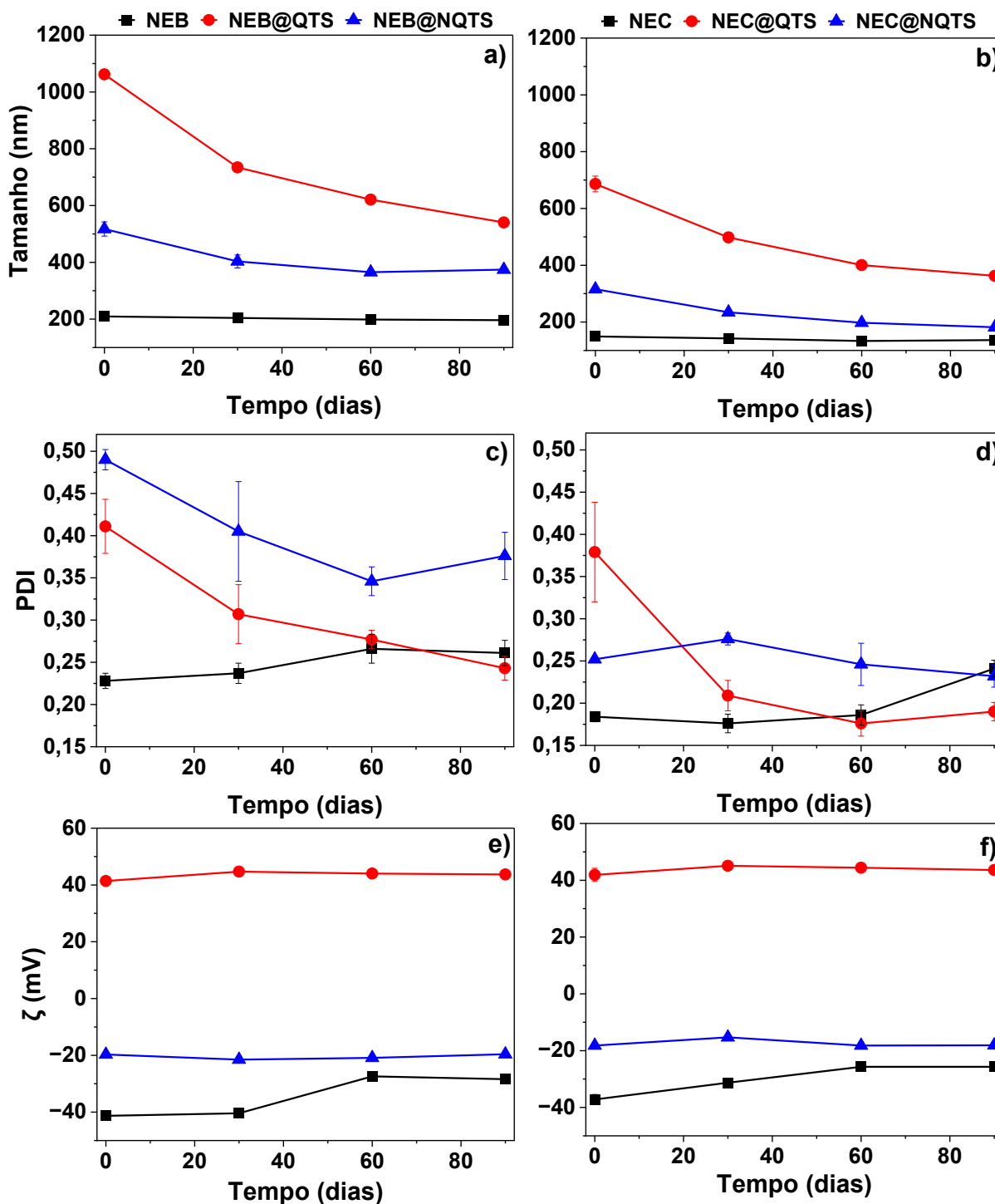
Analisando os dados da Tabela 12, o recobrimento de ambos os polímeros nas nanoemulsões foi evidenciado. Tanto para a QTS quanto para a NQTS, foi observado que o tamanho das nanoemulsões onde estes estão presentes aumenta em comparação as nanoemulsões puras. O PDI só ficou abaixo de 0,3 para a NEC@NQTS. Os valores de tamanho aumentaram mais com a quitosana do que com a modificada, sugerindo que pela massa molar da quitosana ser maior do que da N-succinil quitosana reflete nos diâmetros hidrodinâmicos dos recobrimentos. Outro fator importante a se observar é o potencial zeta, que para os recobrimentos com QTS ficou em torno de 40 mV, justamente pelas cargas catiônicas dos grupos amino protonados do polímero, que vão ajudar para estabilização eletrostática. Já para a NQTS, os valores de potencial zeta continuam negativos, porém o valor está menor em módulo, o que pode indicar que a carga negativa na verdade vem dos grupos carboxilatos presentes no polímero modificado. Para entender melhor esses sistemas e ver seu comportamento, as formulações foram armazenadas em temperatura ambiente e tiveram esses mesmos parâmetros avaliados num período de 90 dias.

5.2.3 Estabilidade dos sistemas preparados por DLS

Fazendo uma avaliação da estabilidade desses sistemas armazenados a temperatura ambiente (Figura 20), foi observado que os recobrimentos com quitosana estabilizaram com o tempo, provavelmente o tempo para o polímero se organizar ao

redor da gotícula de nanoemulsão e interagir bem por carga eletrostática com a lecitina. Os recobrimentos com NQTS também ficaram com valores menores de tamanho e PDI com o tempo, indicando que também houve uma organização dele ao redor das gotículas na NE, mas menos do que a QTS. Os valores de potencial zeta tanto para os recobrimentos com a QTS quanto para a NQTS se mantiveram praticamente inalterados quando comparados as nanoemulsões puras. A QTS parece ter estabilizado mais o sistema do que a NQTS, mas vale lembrar que o uso do polímero modificado se deve também às suas propriedades significativas na área de renegeração tecidual, e que a ideia do trabalho é construir um sistema que possa atuar como um todo, tendo, portanto, um efeito sinérgico entre a NQTS, o citral e o óleo de abacate.

Figura 20. Estudo de estabilidade durante 90 dias das NEs pré e pós revestimento com os polímeros. Onde a), c) e e) são os parâmetros avaliados para as brancas, e b), d) e f) os parâmetros avaliados para as formulações com citral.



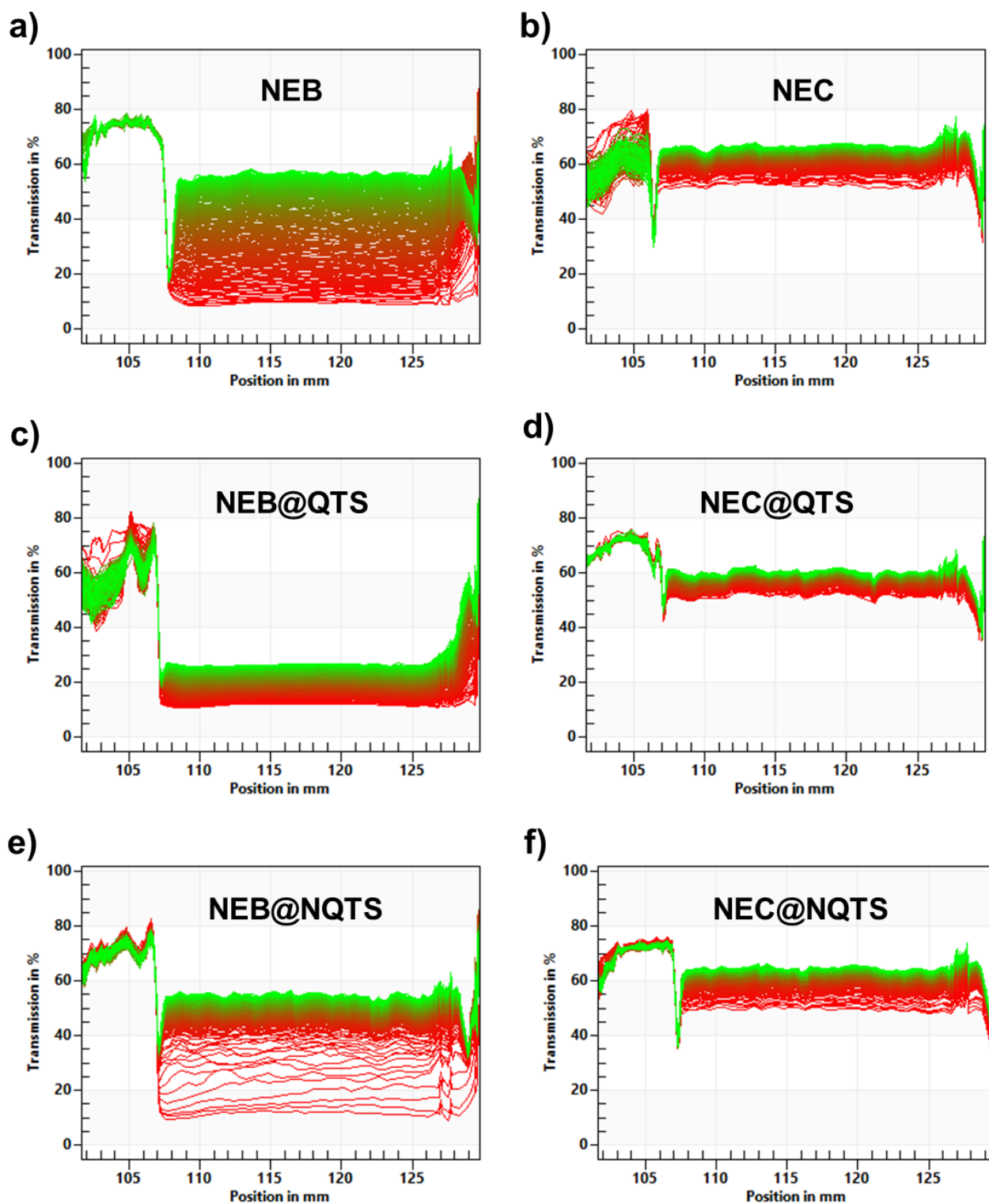
5.2.4 Estabilidade acelerada por *LUMISizer*®

A estabilidade física de nanoemulsões foi analisada utilizando o *LUMISizer*® (Figuras 21 e 22). A estabilidade foi avaliada com base na evolução dos perfis de transmissão integrada ao longo do tempo, determinados a 2500 rpm por 5 horas a 25 e 37°C. A posição nos perfis de transmissão em torno de 108 mm corresponde à altura de enchimento das emulsões, enquanto a posição do fundo da célula está a 130 mm. Esses perfis de transmissão refletem a variação na concentração de gotículas dentro da emulsão, onde uma alta transmissão indica uma baixa concentração de gotículas, enquanto uma baixa transmissão aponta para uma alta concentração de gotículas. Assim, quanto maior a variação na transmissão durante a centrifugação, menor é a estabilidade das nanoemulsões (Dammak; Sobral, 2021; Wanyi *et al.*, 2020).

Nos perfis a 25°C (Figura 21), comparando as nanoemulsões brancas com as nanoemulsões com citral é visível que o aspecto inicial influenciou nos primeiros perfis, já que, a NEB se apresenta com um aspecto mais leitoso opaco, e a NEC tem um aspecto mais translúcido, justamente pelo tamanho das gotículas dispersas e pela concentração de óleo vegetal que está disperso. A primeira linha vermelha corresponde ao primeiro perfil analisado, e a última linha verde é referente ao último perfil avaliado. Quanto mais distantes estiverem essas linhas, mais instável é a nanoemulsão. Portanto, as amostras NEB e NEB@NQTS provavelmente apresentaram algum tipo de separação de fase, como floculação, deixando o último perfil com um valor bem maior de transmissão de luz. As amostras com citral apresentaram pouca diferença entre o primeiro e último perfil, indicando que são amostras estáveis. Entretanto, a flutuação na transmissão de luz da amostra NEC@QTS pode indicar que a quitosana sofreu formação de coágulos, que poderiam estar causando essa variação durante a análise.

Este estudo é de extrema importância para determinação de tempo de prateleira de emulsões. Geralmente quando a formulação fica estável durante todo o tempo do teste à 25°C é possível mensurar um tempo de prateleira de 6 meses para o produto (Dammak; Sobral, 2021).

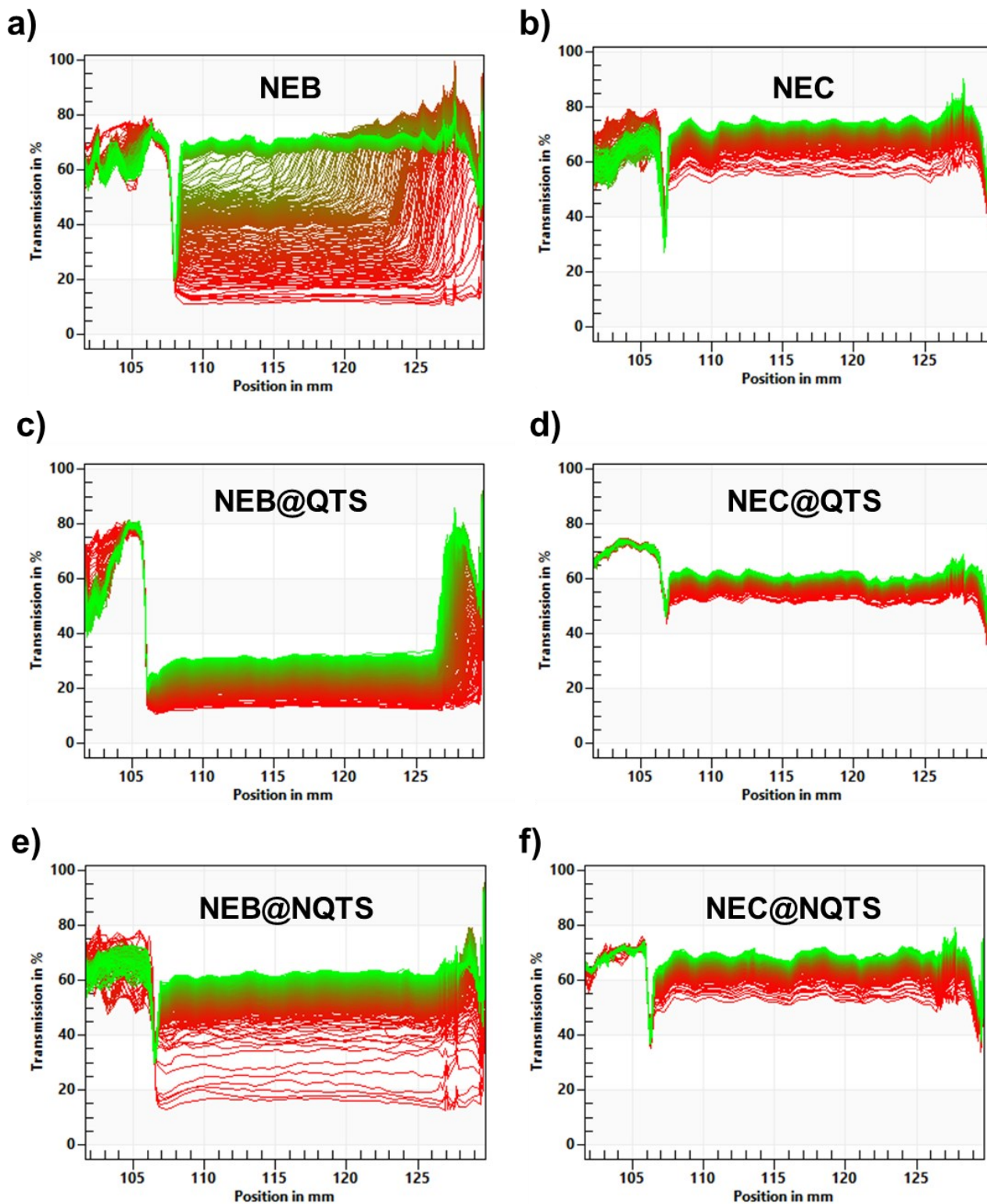
Figura 21. Gráficos dos perfis a 25 °C feitos pelo equipamento *LUMISizer*®. a) NEB; b) NEC; c) NEB@QTS; d) NEC@QTS; e) NEB@NQTS; e f) NEC@NQTS.



Já nos perfis a 37°C (Figura 22), pode-se observar que a temperatura pode afetar muito os sistemas. Nos perfis das nanoemulsões brancas há uma tendência

maior a separação das fases o/a, por conta da distância entre o primeiro e último perfil (Wanyi *et al.*, 2020).

Figura 22. Gráficos dos perfis a 37 °C feitos pelo equipamento *LUMISizer*®. a) NEB; b) NEC; c) NEB@QTS; d) NEC@QTS; e) NEB@NQTS; e f) NEC@NQTS.



Observando a Figura 22, é evidente que a quitosana trouxe uma maior estabilidade para a NEB, provavelmente por conta da estabilização estérica em conjunto com a estabilização eletrostática, já que os valores de potencial zeta para NEB@QTS ficaram próximos de 40 mV. Já para as nanoemulsões com citral, os perfis de transmissão ficaram com muitas variações de flutuação na intensidade da luz transmitida, podendo indicar que os sistemas sofreram floculação, gerando agregados maiores que possivelmente causaram as flutuações vistas nos perfis (Dammak; Sobral, 2021). Portanto, é possível sugerir que os produtos sejam armazenados em local fresco, abaixo de 25°C para não provocar alterações significativas nas formulações.

Para obter uma melhor compreensão da estabilidade física dos sistemas foram calculados os índices médios de instabilidade (Tabela 13), que estão inversamente relacionados à estabilidade das nanoemulsões. Quanto menor o índice de instabilidade, mais estável é a emulsão (Wanyi *et al.*, 2020).

Tabela 13. Índices de instabilidade obtidos para os sistemas pelo *LUMISizer*®

Amostra	Índice de instabilidade (I.I.)	
	25°C	37°C
NEB	0,579	0,722
NEB@QTS	0,187	0,230
NEB@NQTS	0,560	0,598
NEC	0,359	0,490
NEC@QTS	0,210	0,253
NEC@NQTS	0,360	0,599

NEB – nanoemulsão branca; NEC – nanoemulsão com citral; QTS – quitosana, NQTS – N-succinil quitosana.

Os resultados vistos nos gráficos são confirmados pelos índices de instabilidade obtidos para as amostras. Todas as formulações ficaram mais instáveis com o aumento da temperatura, o que já era esperado, por conta do aumento da agitação das partículas e com isso mais evidenciados os fenômenos de separação.

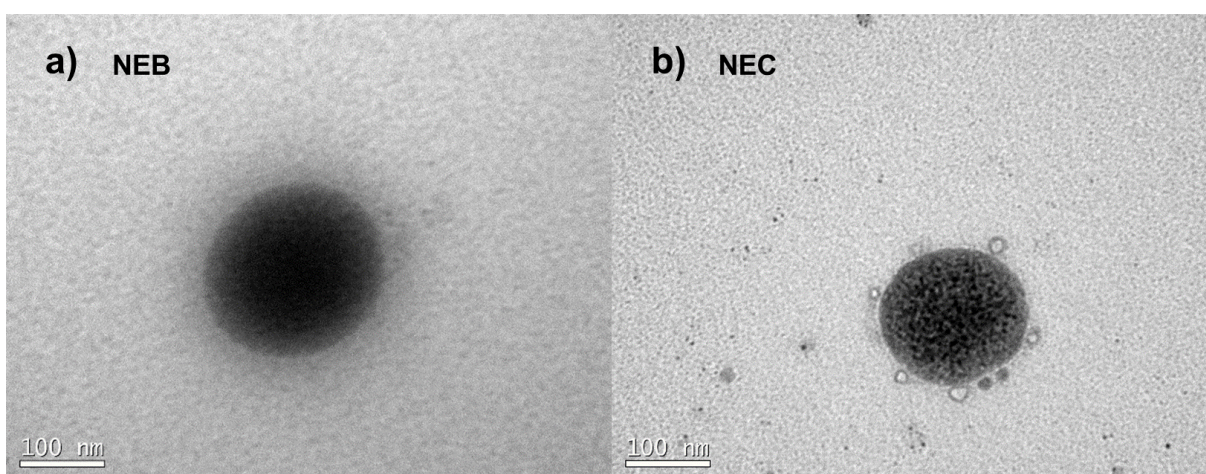
Mesmo assim, as amostras revestidas com quitosana demonstraram ter uma estabilidade superior às outras formulações, o que confirma também o estudo de estabilidade feito no item 5.2.3. Já as amostras com a NQTS ficaram com estabilidade próxima das nanoemulsões puras, indicando que ela não desestabiliza o sistema e que seu uso nas formulações será para ter o efeito sinérgico do polímero com o citral na avaliação dos testes biológicos.

5.2.5 Análise da morfologia das nanoemulsões revestidas através de TEM

Através da análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), foi possível observar a morfologia das nanoemulsões puras (Figura 23a), e também das nanoemulsões brancas recobertas (Figura 23b). Não foi possível avaliar a morfologia das nanoemulsões com citral revestidas, em razão da greve dos servidores que afetou também o laboratório de microscopia.

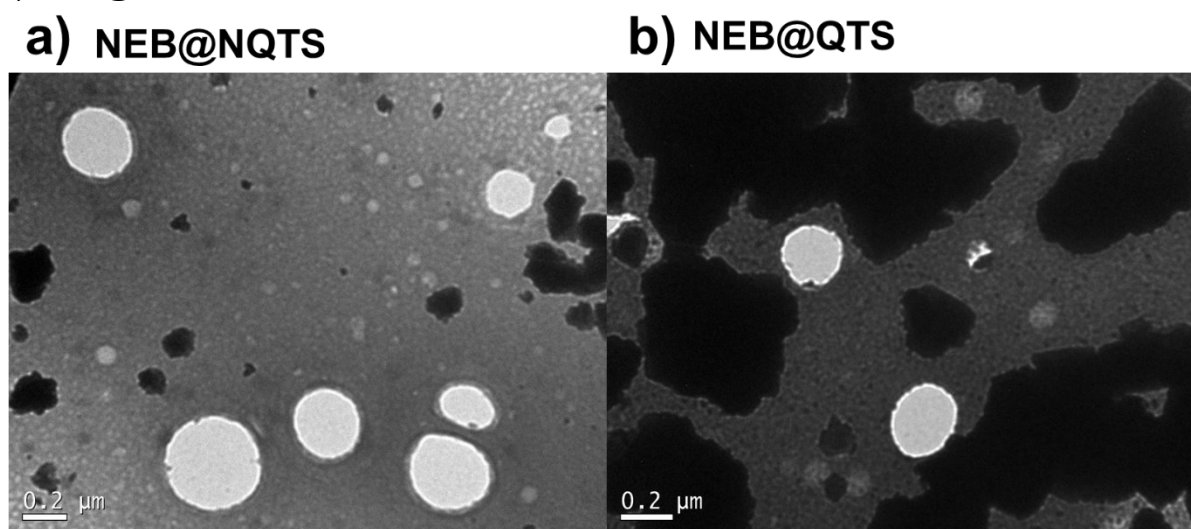
Na Figura 23a pode-se observar que ambas as NEs puras apresentam formato esférico e uma coloração escura, como já observado anteriormente em outro estudo do grupo. (Saatkamp et al., 2023) Não foi possível obter um histograma do tamanho da NEs, devido à complexidade da realização de TEM para partículas de material mole e autoassociado.

Figura 23. Imagens de microscopia atômica de transmissão das nanoemulsões sem citral (a) NEB e das nanoemulsões com citral (b) NEC.



Após o recobrimento das NEs sem citral com quitosana (Figura 24b) e com a quitosana modificada (Figura 24a) é possível observar que as mesmas mantiveram o formato esférico, assim como observado nas amostras não recobertas.

Figura 24. Imagens de microscopia atômica de transmissão das NE's sem citral revestidas com a quitosana modificada (a) NEB@NQTS e revestida com quitosana (b) NEB@QTS



5.2.6 Análise da morfologia das nanoemulsões revestidas através de AFM

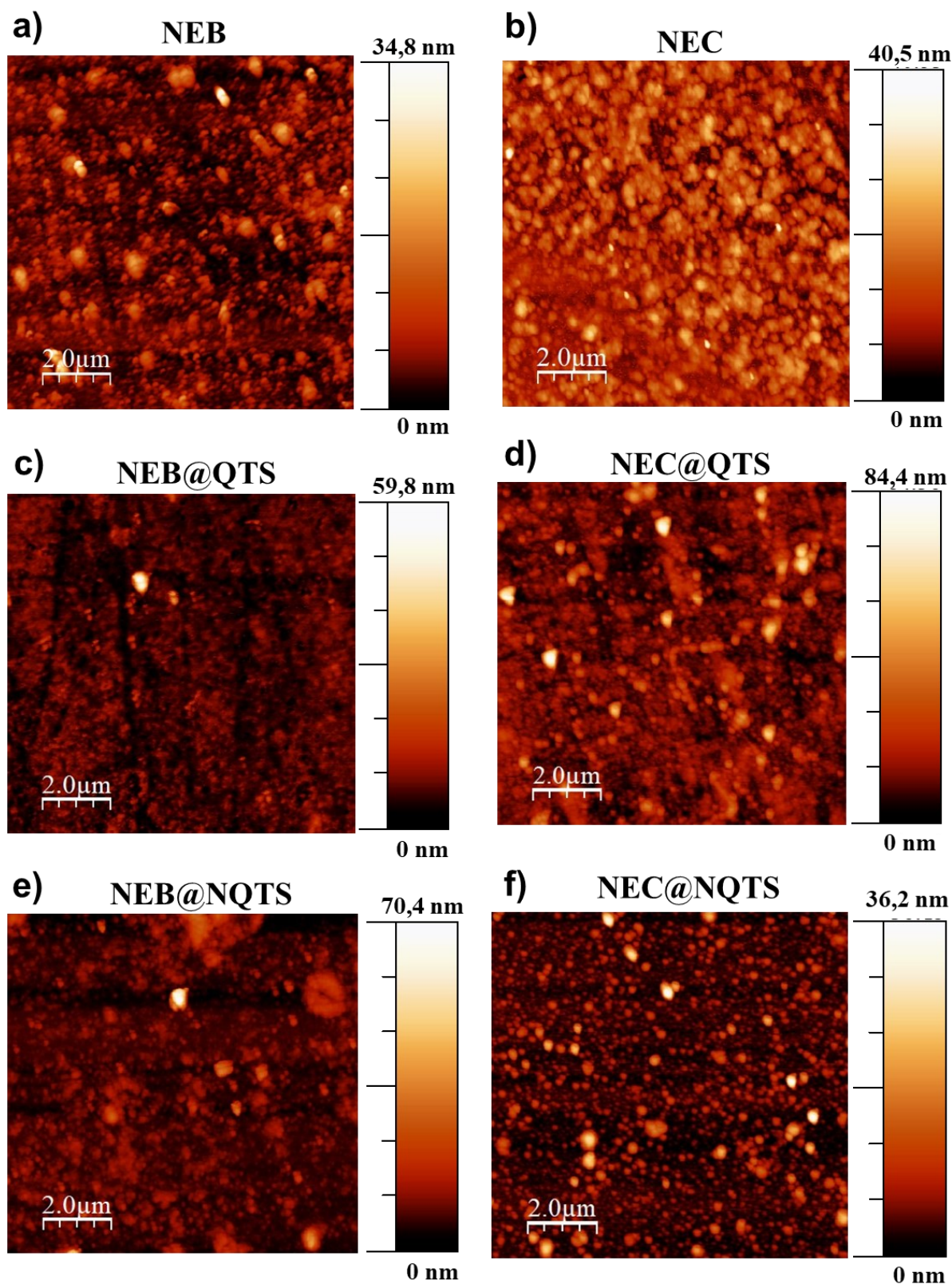
A técnica de microscopia de força atômica (AFM) possui uma alta resolução ($\pm 0,1$ nm) permitindo a visualização direta de moléculas ou átomos individuais e pode ser utilizada como uma ferramenta complementar na caracterização de nanoemulsões. No *tapping mode* é feita uma varredura com uma sonda afiada de tamanho nanométrico sobre uma amostra que foi presa em uma superfície cuidadosamente selecionada, que pode ser de vidro ou mica. O resultado obtido é um perfil tridimensional (ou bidimensional) de alta resolução da superfície em estudo (Banasaz *et al.*, 2020).

Avaliando as imagens bidimensionais geradas pela varredura do microscópio de força atômica (Figura 25), é possível avaliar a morfologia dos sistemas antes e após o recobrimento e comparar com as imagens de TEM. Mesmo após o revestimento com o polímero, as NE's apresentaram formato esférico, que já era previsto para esses colóides (López Angulo *et al.*, 2024; Tubtimsri *et al.*, 2018). Em algumas imagens há o aparecimento de gotículas com uma forma mais elipsoidal,

entretanto, pode-se dizer que eram esféricas e passaram por alguma deformação devido à perda de água que ocorreu na superfície de suporte (López Angulo *et al.*, 2024).

Comparando as nanoemulsões antes e após o recobrimento, é possível observar que nas NE's puras há uma maior aglomeração das gotículas de óleo, e nas NE's revestidas com os polímeros há um maior "espaçamento" entre as gotículas, principalmente com as gotículas revestidas com quitosana, podendo estar relacionado com a alta estabilidade eletrostática gerada pela repulsão entre as cadeias de quitosana positivamente carregadas que estão na superfície das nanogotas. Com a NQTS esse espaçamento é menor, porém as gotículas parecem ter ficado com um formato mais perto do esférico do que com a QTS, sugerindo que o recobrimento foi eficaz.

Figura 25. Imagens de microscopia de força atômica das NE's antes e após o revestimento, onde a, c e e) é da NE branca pura, com QTS e NQTS, respectivamente, e b, d e f) é a NE com citral pura, QTS e NQTS, respectivamente.

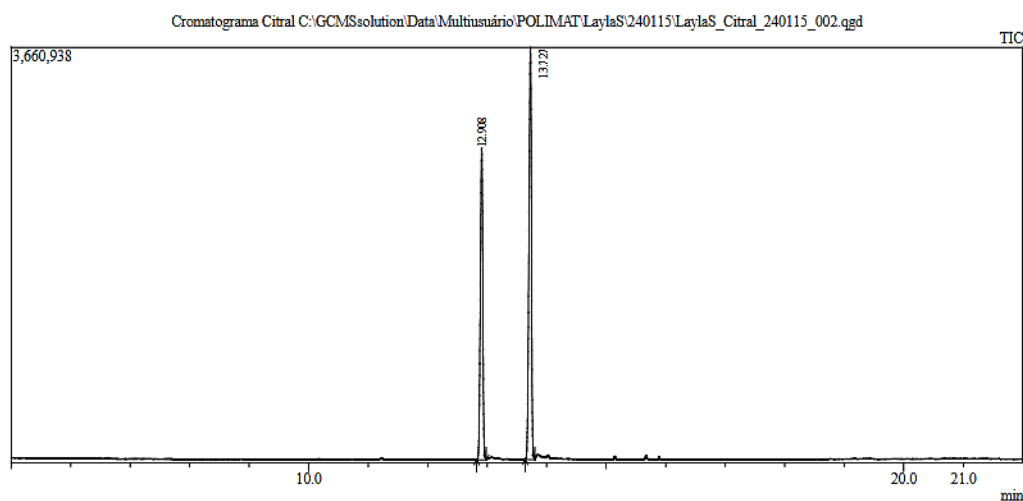


5.3 QUANTIFICAÇÃO DO CITRAL

5.3.1 Resultados da otimização/cromatogramas obtidos para o citral

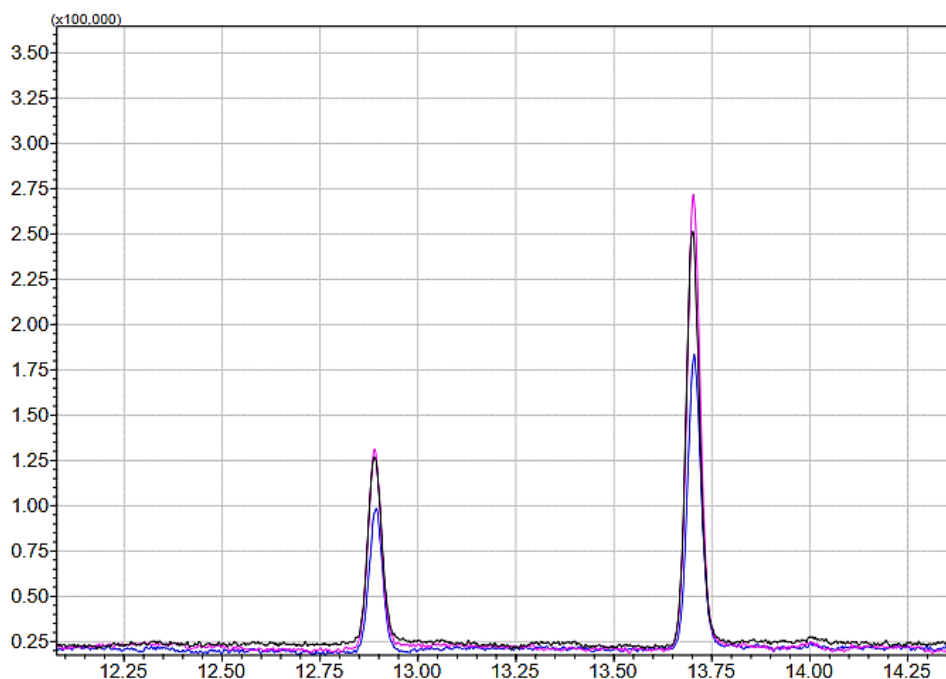
Primeiramente foi realizado um teste com 20 μL de citral puro em um frasco de *headspace* de 20 mL, que ficou equilibrando durante 10 minutos e depois passou pelo processo de extração por 10 minutos também (Figura 26). Como era esperado, saíram dois picos com intensidade elevada, o primeiro com tempo de retenção em aproximadamente 12 minutos é o Neral (cis-citral), e o segundo com tempo de retenção em 13 minutos é o geranial (trans-citral), ambos identificados pela biblioteca do próprio equipamento da *Shimadzu* de espectrometria de massas (Apêndice D), com similaridade >95%.

Figura 26. Cromatograma citral puro, obtido por SPME



A partir disso foram feitos testes para otimizar o tempo de análise e tornar mais ágil o processo de extração. Dessa maneira, foi feita uma solução aquosa de citral a 6 mg L^{-1} , onde foram testados 5, 10 e 20 minutos de extração (passado por 10 minutos de equilíbrio antes de cada um) (Figura 27). Foi observado que os tempos de 10 (preto) e 20 (rosa) minutos tiveram áreas de picos (Neral e Geranial) muito próximos. E, portanto, para otimizar o tempo de análise, foi escolhido 10 minutos de extração.

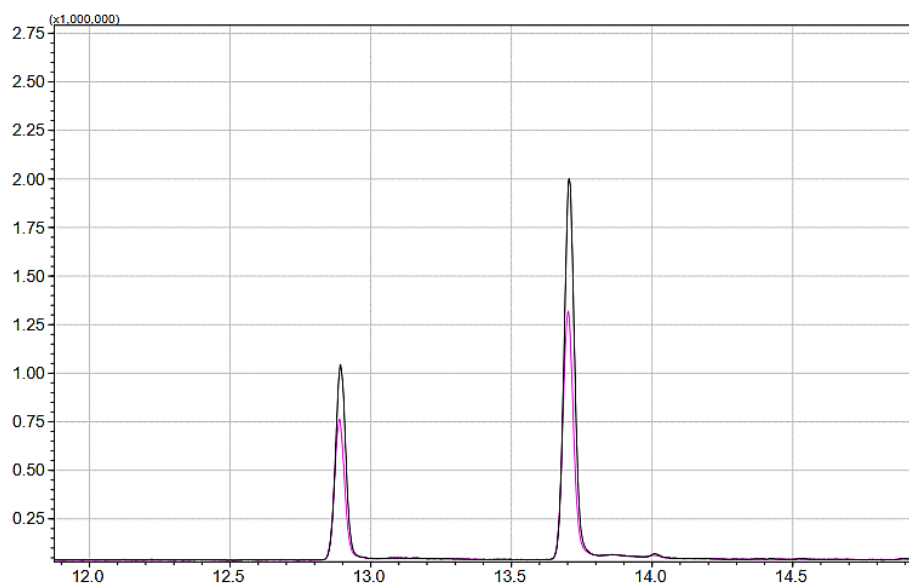
Figura 27. Diferentes tempos de extração para uma solução de citral a 6 mg L^{-1} (—) 5 minutos de extração, (—) 10 minutos de extração e (—) 20 minutos de extração.



Como o sistema da nanoemulsão é uma matriz complexa, também foi testada a interferência da matriz na extração do citral. Além dos dois equilíbrios envolvidos na extração por *headspace*, há também o equilíbrio de saída do citral das gotículas da nanoemulsão para o meio aquoso, o que pode afetar a forma como o citral é absorvido pela fibra (Lancioni *et al.*, 2022). Para avaliar possíveis efeitos de matriz, foram preparadas duas soluções com a mesma massa de citral: uma em água e outra em matriz NEB (Figura 28).

Observou-se uma mudança significativa no cromatograma. O citral em matriz NEB (rosa) provavelmente interage com o óleo de abacate disperso na nanoemulsão, o que explicaria a menor intensidade. Pode-se afirmar que o citral é mais volátil em água (preto), pois possui uma elevada pressão de vapor e, nesse caso, passa por dois equilíbrios: o equilíbrio entre a fase líquida e a fase gasosa, e o equilíbrio de adsorção na fibra. Já o citral na nanoemulsão passa pelo equilíbrio de saída das gotículas de óleo dispersas para o meio aquoso e, como interage com o óleo de abacate, este equilíbrio é significativo e não pode ser ignorado.

Figura 28. Comparação entre citral solubilizado em água (—) e em matriz NEB (—).

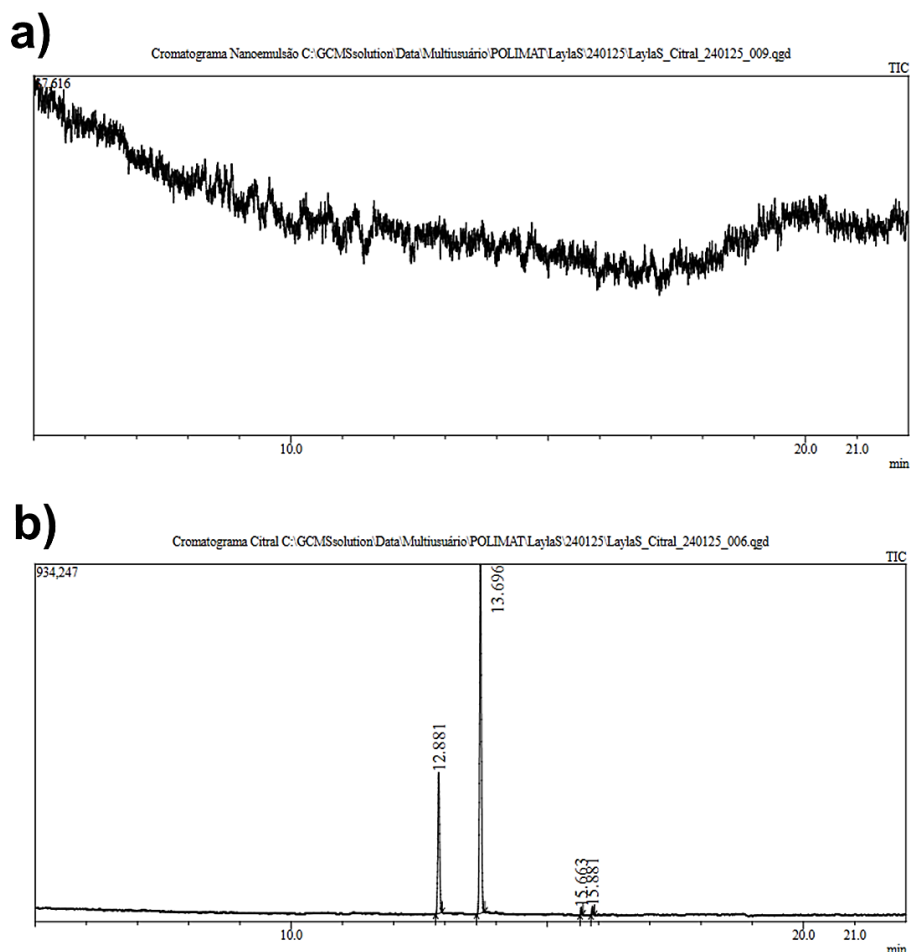


5.3.2 Elaboração da curva de calibração e validação analítica pro citral

Como descrito no item 4.3.2.3.3, foram avaliados parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade e LOD/LOQ.

A seletividade foi avaliada através da análise de uma NEB e comparando com uma NEC (Figura 29). Fica evidente que a fibra é seletiva para compostos voláteis, pois o cromatograma da NEB não apresentou nenhum pico aparente, apenas linha base (Figura 29a). Já o cromatograma da NEC, mostra os dois picos referente aos dois isômeros do citral, com os mesmos tempos de retenção. Também apareceram dois picos pequenos com tempos de retenção maiores, que podem ser outros compostos presentes na amostra de citral, já que ela tem 95% de pureza (Figura 29b).

Figura 29. Cromatogramas para avaliação da seletividade. a) NEB e b) NEC



A linearidade foi avaliada pela relação entre os pontos obtidos e seu ajuste para uma regressão linear. Considerando o efeito de matriz da NE no citral, foi feita uma NEB com mesmas condições da amostra real (NEC), e com isso foram obtidas as áreas de pico elucidadas na Tabela 14 (os cromatogramas encontram-se no apêndice C):

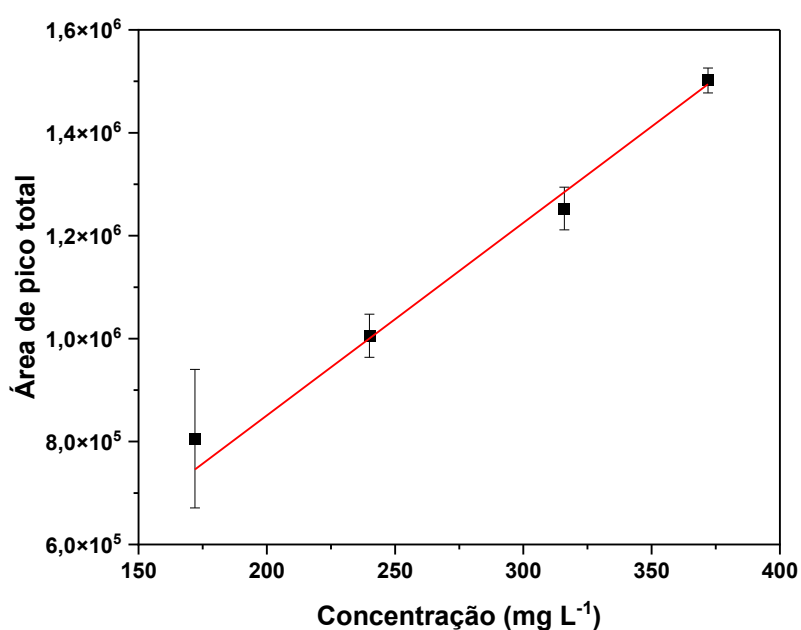
Tabela 14. Curva de calibração do citral em matriz NEB.

Concentração / mg L ⁻¹	Média área*	Desvio*	RSD (%)
172	805513	134585,4	16,71
240	1005504,7	41893,65	4,17
316	1252760	41496,4	3,31
372	1501704,3	24139,68	1,61

*Número de amostras (n): n = 3

A partir desses dados, foi feito o teste de linearidade (Figura 30), que foi satisfatório para determinação do teor de citral nas nanoemulsões. Pela Tabela 14, também já fica elucidado o teste de precisão, pois todos os valores de desvio padrão relativo (RSD) ficaram abaixo de 15% e o primeiro ponto ficou abaixo de 20% sendo o limite de quantificação do método nestas condições (Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018; Stickle, [s. d.]).

Figura 30. Curva de calibração do citral em GC-MS por SPME.



A partir da curva (Figura 30), a Tabela 15 mostra os resultados obtidos para a equação da reta:

Tabela 15. Dados do ajuste linear para os pontos da curva de calibração

Coef. Angular	Coef. Linear	R ²	LOD (mg L ⁻¹)
3743 ± 222	102061 ± 74587	0,99302	65,8

O limite de detecção foi calculado através da relação entre o desvio do coeficiente linear e o coeficiente angular (Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018; Stickle, [s. d.]).

Para avaliar a exatidão do método, foram utilizados os próprios pontos da curva de calibração, de modo que a partir das áreas de pico obtidas para esses pontos, foram aplicadas na equação da reta para calcular a concentração experimental e com isso determinar o erro relativo quando comparada com a concentração teórica (Tabela 16).

Tabela 16. Ensaio de exatidão para a curva de calibração.

Concentração teórica / mg L ⁻¹	Concentração Experimental / mg L ⁻¹	Erro relativo (%)
172	187,9	9,27
240	241,4	0,57
316	307,4	2,71
372	373,9	0,52

Como já era esperado, o erro relativo foi maior para o primeiro ponto da curva, mas por conta da complexidade da amostra erros de até 20% são considerados “aceitáveis” (Ribani *et al.*, 2004; Stickle, [s. d.]). Todos os outros pontos tiveram erros menores que 5%, sendo aceitos para validação da exatidão do método.

A partir disso, foi possível determinar o teor de citral nas nanoemulsões que seguiram para os testes biológicos. Pelo o citral ser um composto altamente volátil, para cada teste biológico (citotoxicidade e antibacteriana) foi feita uma nova formulação, que foi armazenada em um frasco de modo que não houvesse espaço de *headspace*, evitando assim erros de concentração. Essas amostras foram então analisadas para determinar o teor, já que é esperada uma certa perda de citral pelo método de fabricação (Emulsificação espontânea) no momento de as amostras serem rotaevaporadas. Por não saber exatamente a quantidade de citral que é perdida no processo de preparo das NEs, as mesmas foram convenientemente diluídas em água diretamente no *vial* de *headspace*, de modo que pudessem estar na faixa de concentração da curva de calibração. Dessa forma, foram obtidas as seguintes concentrações para os dois lotes fabricados (Tabela 17):

Tabela 17. Resultados obtidos para teores de citral em dois lotes de NEC preparados.

NEC_lote	Data Fab	Média*	Desvio*	RSD (%)	Concentração final / mg L ⁻¹
1	17/05/24	1238983	30934,5	2,50	758,4
2	05/06/24	1527691	99586	6,5	968,2

*Número de amostras (n): n = 2

Se considerássemos que não houvesse nenhuma perda de citral ao longo do processo, a concentração final no sistema seria próxima de 1600 mg/L. No entanto, houve uma perda significativa de citral durante a preparação das nanoemulsões (NEs). Considerando as datas em que foram feitas, variações de temperatura podem ter afetado substancialmente a concentração final obtida. Seria interessante investigar uma outra maneira de incorporar o citral no sistema, como, por exemplo, uma adição passiva após a preparação da nanoemulsão em branco, similar ao procedimento utilizado para os pontos da curva de calibração. É importante lembrar que, embora o citral não seja insolúvel em água, sua solubilidade é baixa, aproximadamente 600 mg/L. Não se pode afirmar que o citral está encapsulado na nanoemulsão sem estudos de eficiência de encapsulação.

Neste trabalho, foram realizados estudos de eficiência de encapsulação, mas descobriu-se que o filtro utilizado (composto de polímero de acetato de celulose) apresentou seletividade para o isômero geranial. Isso resultou em intensidades e áreas de pico no cromatograma que não mantinham as proporções corretas, já que o citral não é uma mistura racêmica dos isômeros; o geranial está presente em maior proporção do que o neral. A razão exata para a seletividade do filtro para o trans-citral não é clara, mas possivelmente envolveu interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, que acabaram invalidando os ensaios de eficiência.

Mesmo assim, pode-se dizer que parte do citral foi encapsulada, já que as nanoemulsões apresentaram concentrações acima do seu limite de solubilidade em água. Para testar a teoria da temperatura afetar a concentração final, foi feito um outro lote no dia 20/06/24, onde a temperatura ambiente no dia estava mais baixa, e então foi feito o ensaio de quantificação pra verificar a concentração final (Tabela 18).

Tabela 18. Resultado de teor para NEC feita dia 20/06/24.

NEC_lote	Data Fab	Média*	Desvio*	RSD (%)	Concentração final / mg L ⁻¹
3	20/06/24	1184695	22034,2	1,86	1438

*Número de amostras (n): n = 2

Esse resultado reforça a ideia de que o citral é um composto muito volátil, e como a temperatura influencia muito nessa propriedade. Portanto seria interessante fazer um estudo de composição ao longo do tempo, para ver quanto tempo o citral pode ficar retido na formulação e ter uma ideia mais quantitativa desse valor. Já haviam sido feitos alguns testes comparando sistema aberto de sistema fechado com as nanoemulsões contendo citral, porém por conta das variações de temperatura ao longo do ano não foi possível quantificar.

Após a quantificação, os lotes NEC_1 e NEC_2 seguiram para os ensaios de atividade antimicrobiana e citotoxicidade respectivamente. As nanoemulsões que foram revestidas, tiveram sua concentração recalculada a partir do teor obtido para elas puras, e houve muito cuidado durante o processo para ter o mínimo de perda de voláteis.

5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.4.1 Ensaio de citotoxicidade das formulações finais

Uma formulação destinada a aplicação biomédica deve ser atóxica ou só levemente tóxica para o organismo. Desse modo, foram realizados testes para avaliar se as formulações preparadas possuem toxicidade contra células embrionárias renais humanas (HEK293), pois essa linhagem também foi considerada como células epiteliais embrionárias renais (Stepanenko; Dmitrenko, 2015), podendo ser utilizada neste estudo como comparação à células epiteliais (fibroblastos). Após os tratamentos de 24 e 48 horas, as plaquinhas foram fixadas e analisadas em espectrofotômetro UV-vis, os resultados foram organizados na forma de gráficos e apresentados nas Figuras 31 e 32.

O potencial citotóxico é classificado de acordo com a porcentagem de viabilidade celular (<50% tóxico; 51–70% levemente tóxico; >71% não citotóxico) ((Martínez Ávila *et al.*, 2014; Thao *et al.*, 2021).

Os ensaios demonstraram que em 24 horas de tratamento, todas as formulações apresentaram viabilidade celular acima de 100%, inclusive os controles separadamente, sugerindo que as nanoemulsões com e sem revestimento estimularam a proliferação celular, o que é um resultado interessante para formulações visando a cicatrização de feridas. Thao *et al.*, (2021) investigou a citotoxicidade de filmes de NQTS e NPs de NQTS em células fibroblásticas dérmicas humanas, HDF. Os resultados obtidos mostraram que o polímero não apresentou atividade citotóxica após 48 horas de tratamento, inclusive foram obtidas viabilidades percentuais acima de 100% até nas amostras mais concentradas, mostrando o excelente efeito proliferativo que a NQTS promove.

O citral puro, a NEC, a NEB@NQTS e a NEC@NQTS apresentaram toxicidade leve <70% nos ensaios de 48h, nas concentrações mais altas sugerindo que até certo ponto as formulações não apresentam toxicidade, portanto essa informação é importante para futuramente pensar em ajustes de dosagem para tratamento.

Figura 31. Resultados ensaio de citotoxicidade para formulações e controles com citral aplicadas a linhagem HEK293

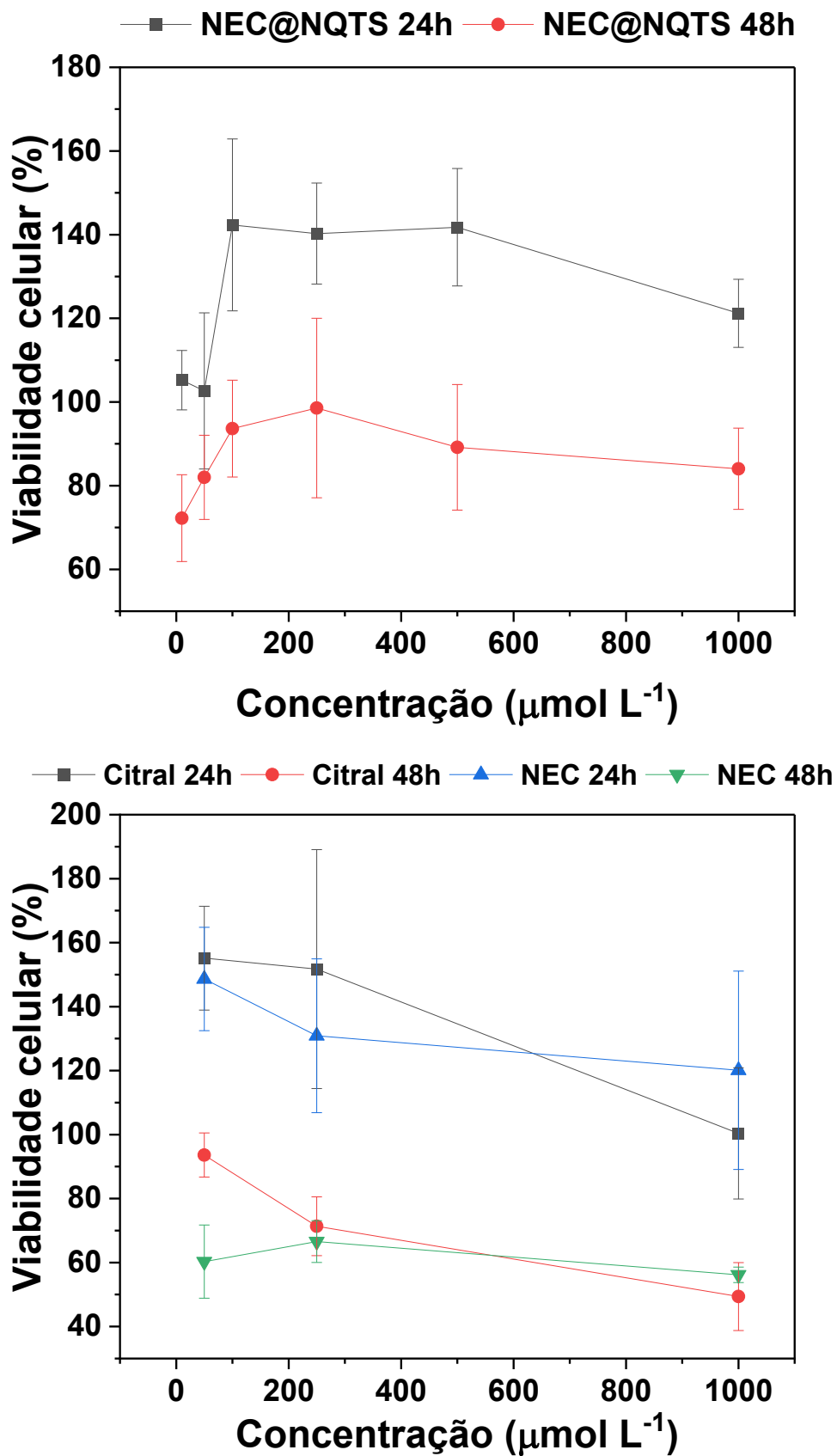
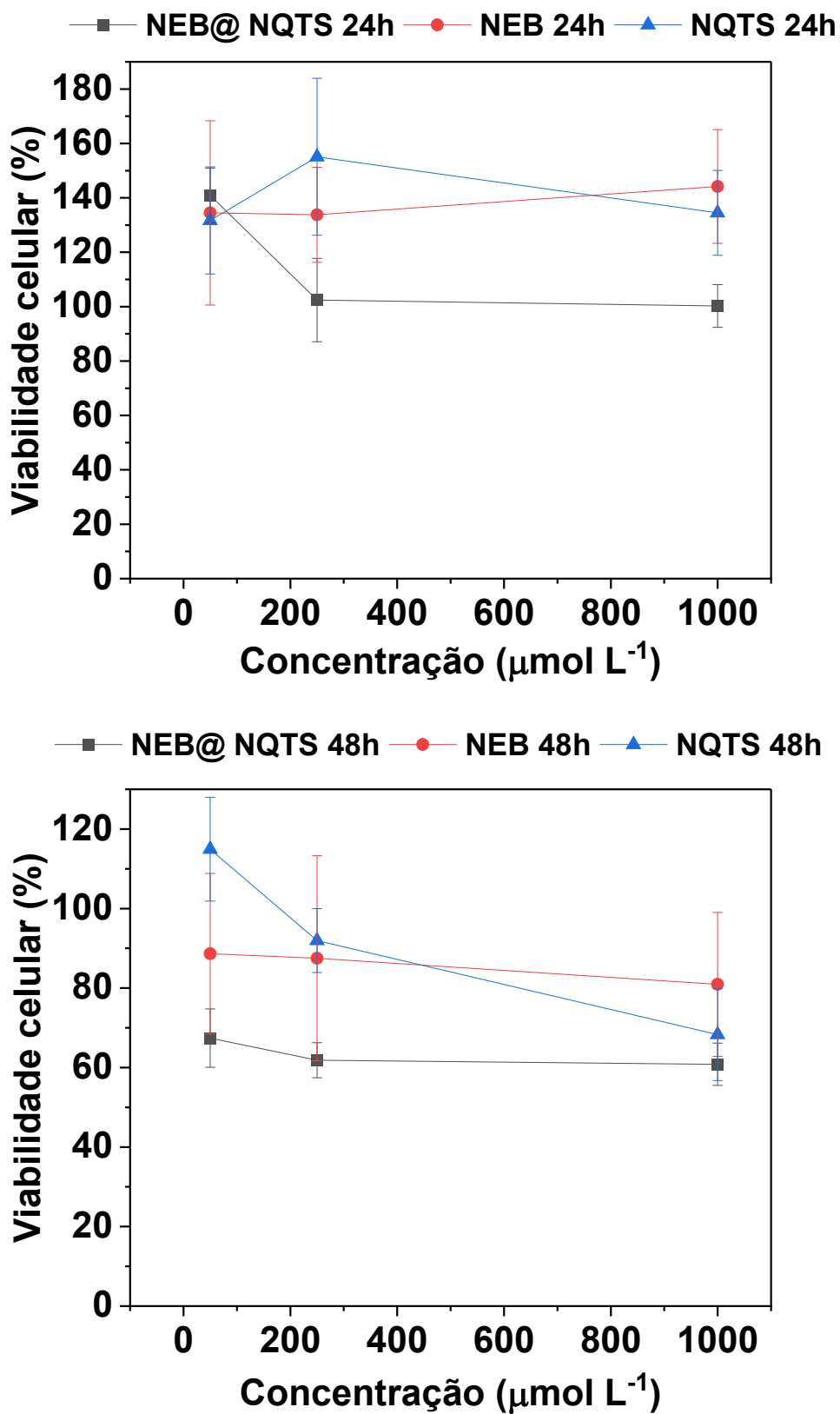


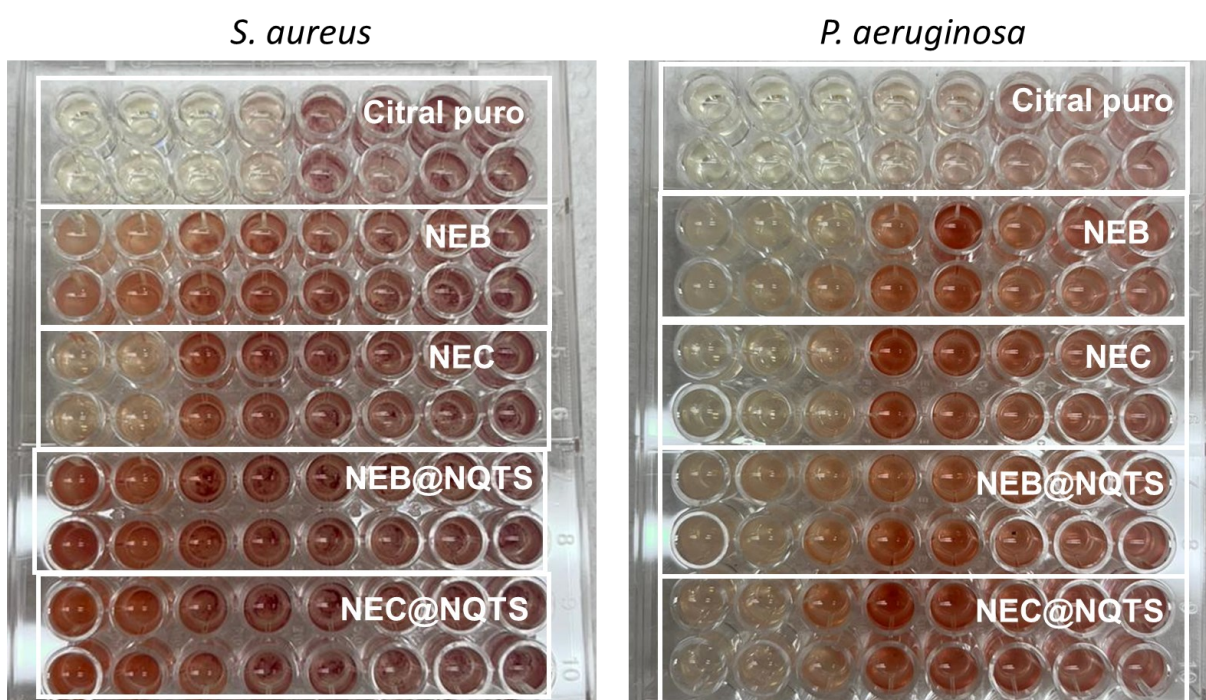
Figura 32. Resultados ensaio de citotoxicidade para formulações e controles com citral a linhagem HEK293.



5.4.2 Ensaio de atividade antibacteriana

Após 24h com o tratamento utilizando as formulações, a avaliação visual para determinação da MIC foi feita (Figura 33). Esse ensaio é dito como semiquantitativo, pois a leitura é feita somente pela avaliação visual. Com a imagem abaixo as concentrações foram recalculadas conforme a diluição seriada, sendo a MIC o pocinho anterior ao primeiro que tiver crescimento bacteriano. Os controles desse ensaio se encontram no Apêndice F. Desse modo foi construída a Tabela de resultados (Tabela 20).

Figura 33. Resultado do teste de atividade antibacteriana das formulações: a) Em *Staphylococcus aureus* e b) Em *Pseudomonas aeruginosa*



Observando os resultados do ensaio, coincidentemente o citral puro teve o mesmo valor de MIC para ambas as bactérias, que foi de 250 mg L^{-1} . No caso da *S. aureus*, alguns trabalhos já relataram um valor próximo do observado (Bonferoni *et al.*, 2017; Soltanzadeh *et al.*, 2021). De forma inesperada, apenas a nanoemulsão contendo citral puro (NEC) apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Essa descoberta contrasta com as expectativas iniciais, que previam a atuação do polímero NQTS e da nanoemulsão revestida com citral como agentes antimicrobianos.

Mesmo assim, em comparação ao citral puro, a NEC teve um valor de MIC igual a 189,5 mg L⁻¹, isto é, a nanoemulsão com citral não só manteve a atividade dele como aumentou aproximadamente 1,3x, o que é um resultado satisfatório.

No caso da *P. aeruginosa*, a nanoemulsão branca (NEB) e a branca revestida com o polímero também apresentaram atividade, e inclusive, na NEB@NQTS o valor de MIC (considerando a massa de óleo de abacate usada na nanoemulsão) foi menor do que na NEB, indicando que a NQTS pode ter contribuído também com efeito sinérgico. No trabalho de Hanan *et al.*, (2018) testes utilizando o óleo de abacate contra as mesmas cepas de bactérias foram realizados, onde o óleo vegetal apresentou uma alta atividade inibitória contra *P. aeruginosa* e atividade moderada contra *S. aureus*. O que confirma os resultados vistos neste ensaio.

Já a NEC também apresentou um valor de MIC menor do que o citral puro, mostrando que a atividade aumentou 2,6x, sendo um resultado positivo para este estudo. A NEC@NQTS também apresentou um valor de MIC menor do que o citral puro, porém ainda foi maior do que a NEC sem revestimento. O resultado esperado seria o polímero atuar como adjuvante aumentando a atividade inibitória, como ocorreu com o óleo de abacate, porém não foi isso que ocorreu. Talvez as concentrações de citral utilizadas já estavam defasadas no momento do tratamento, pelo fato do ativo ser extremamente volátil. Mas também as formulações passaram por uma filtração utilizando filtro de seringa de 1,2 µm para tentar esterilizar as formulações, e se o filtro era de acetato de celulose, pode ter ficado ativo retido nele (como ocorreu nos ensaios de eficiência de encapsulação), o que diminuiria bastante a concentração de citral nos meios.

O polímero NQTS não apresentou atividade antibacteriana (Apêndice F) para nenhum dos dois micro-organismos testados, pois houve crescimento bacteriano em todos os pocinhos. Entretanto, a concentração inicial utilizada foi de 0,2% (m/v), correspondente a concentração de polímero nas formulações revestidas. Thao *et al.*, (2021) relatou valores de MIC igual a 6 mg/mL para filmes com NPs de NQTS contra *S. aureus*, e também a MIC apenas do filme de NQTS superior a 8 mg/mL, mostrando que não houve efeito bacteriostático. Eles atribuíram essa baixa atividade bactericida à natureza aniônica da NQTS. Niu *et al.*, (2020) também investigou atividade antibacteriana da NQTS, e obteve um valor de MIC superior a 5 mg/mL contra *S. aureus* e *E. coli*.

Portanto seria necessário repetir o ensaio utilizando uma outra maneira de esterilizar as amostras, já que, um outro ensaio foi feito sem utilizar o filtro e as amostras estavam contaminadas com algum micro-organismo externo.

Tabela 19. Valores de MIC para o citral e para o óleo de abacate (NEB) nos testes de atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Amostra	<i>S. aureus</i> (-)	<i>P. aeruginosa</i> (+)
Citral	250 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
NEB	-	630 mg L ⁻¹
NEC	189,5 mg L ⁻¹	94,75 mg L ⁻¹
NEB@NQTS	-	504,5 mg L ⁻¹
NEC@NQTS	-	151,6 mg L ⁻¹
NQTS	-	-

NEB – nanoemulsão branca; NEC – nanoemulsão com citral; QTS – quitosana, NQTS – N-succinil quitosana.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O polímero NQTS foi sintetizado eficientemente, de acordo com as caracterizações realizadas, possuindo um grau de modificação de 59%.

As nanoemulsões desenvolvidas neste estudo com base nos trabalhos já em curso no grupo se mostraram estáveis e com ampla estabilidade de armazenamento, o que evidencia que o óleo de abacate é um veículo melhor para o preparo das NEs. As nanoemulsões revestidas foram preparadas de modo efetivo, estáveis por mais de 90 dias, o que pode ser atribuído a modificação pelos polímeros. A morfologia dos sistemas se apresentou com formato esférico mesmo após o revestimento com os polímeros, resultado que foi visto através da técnica de TEM e confirmada por AFM.

O método de quantificação de citral foi desenvolvido com efetividade. Entretanto, a variação nos teores a cada lote de NEC preparado reforça a ideia de testar uma adição passiva do citral futuramente para se ter mais controle sobre a composição.

O estudo de citotoxicidade mostrou que em 24h as formulações não apenas não mataram as células do tipo HEK293, como estimularam proliferação celular. Porém em 48h algumas concentrações com citral se mostraram levemente tóxicas. O ensaio de atividade antibacteriana mostrou que a nanoemulsão aumenta a atividade biológica do citral, porém seria interessante repetir os testes utilizando uma outra forma de esterilizar as formulações.

Para perspectivas futuras, espera-se que seja realizado um ensaio de atividade antibacteriana quantitativo, para se confirmar as informações obtidas no ensaio visual realizado neste trabalho. É esperado que seja feito crio-TEM das formulações, pois é mais adequado para o tipo de amostra estudado neste trabalho. Por fim, testes *in vivo* serão realizados com camundongos para avaliar efetividade de cicatrização do produto desenvolvido.

REFERÊNCIAS

- AIPING, Zhu *et al.* Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 274–279, 2006.
- ALMADANI, Yasser H. *et al.* Wound Healing: A Comprehensive Review. **Seminars in Plastic Surgery**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 141–144, 2021.
- ALQAHTANI, A. *et al.* The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 908–931, 2013.
- AMRA, Kesrin *et al.* Therapeutic benefits of natural oils along with permeation enhancing activity. **International Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 484–507, 2022.
- ARDEAN, Cristina *et al.* Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 14, p. 7449, 2021.
- BADSHAH, Haroon *et al.* Protective Effect of Lupeol Against Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation via the p38/c-Jun N-Terminal Kinase Pathway in the Adult Mouse Brain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 48–60, 2016.
- BANASAZ, Shahin *et al.* Encapsulation of Lipid-Soluble Bioactives by Nanoemulsions. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 17, p. 3966, 2020.
- BASHIR, Shahid *et al.* Synthesis, characterization, properties of N-succinyl chitosan-g-poly (methacrylic acid) hydrogels and in vitro release of theophylline. **Polymer**, [s. l.], v. 92, p. 36–49, 2016.
- BESERRA, Fernando Pereira *et al.* Lupeol, a Dietary Triterpene, Enhances Wound Healing in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats with Modulatory Effects on Inflammation, Oxidative Stress, and Angiogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2019, p. 3182627, 2019.
- BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION GUIDANCE FOR INDUSTRY. [s. l.], 2018.
- BONFERONI, Maria Cristina *et al.* A novel ionic amphiphilic chitosan derivative as a stabilizer of nanoemulsions: Improvement of antimicrobial activity of Cymbopogon citratus essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 152, p. 385–392, 2017.
- BONTÉ, F. *et al.* Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. **Planta Medica**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 265–266, 1997.
- BOUCHEMAL, K. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 280, n. 1, p. 241–251, 2004.

BROUGHTON, George; JANIS, Jeffrey E.; ATTINGER, Christopher E. Wound Healing: An Overview:. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 117, n. SUPPLEMENT, p. 1e-S-32e-S, 2006.

BRUGNEROTTO, J *et al.* An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

CAMPOS, Antonio Cl; GROTH, Anne K; BRANCO, Alessandra B. Assessment and nutritional aspects of wound healing:.. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 281–288, 2008.

CHAINANI-WU, Nita. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). **Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 161–168, 2003.

CHEN, Zhiwan *et al.* Succinylated chitosan derivative restore HUVEC cells function damaged by TNF- α and high glucose in vitro and enhanced wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 265, p. 130825, 2024.

DAMMAK, Ilyes; SOBRAL, Paulo José Do Amaral. Curcumin nanoemulsions stabilized with natural plant-based emulsifiers. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 43, p. 101335, 2021.

DENG, Xiaoxuan; GOULD, Maree; ALI, M. Azam. A review of current advancements for wound healing: Biomaterial applications and medical devices. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 110, n. 11, p. 2542–2573, 2022.

DOS SANTOS RAMOS, Matheus Aparecido *et al.* Nanotechnological strategies for systemic microbial infections treatment: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 589, p. 119780, 2020.

DUTT, Yogesh *et al.* Therapeutic applications of nanobiotechnology. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 21, p. 148, 2023.

EBNESAJJAD, Sina. Surface and Material Characterization Techniques. *In*: SURFACE TREATMENT OF MATERIALS FOR ADHESION BONDING. [S. l.]: Elsevier, 2006. p. 43–75. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815515234500067>. Acesso em: 13 jul. 2023.

ELKOMY, Mohammed H.; ALI, Adel A.; EID, Hussein M. Chitosan on the surface of nanoparticles for enhanced drug delivery: A comprehensive review. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 351, p. 923–940, 2022.

EMING, Sabine A.; MARTIN, Paul; TOMIC-CANIC, Marjana. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 265, p. 265sr6, 2014.

ENUMO, Adalberto *et al.* Development of curcumin-loaded chitosan/pluronic membranes for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 163, p. 167–179, 2020.

FRANCO, Diogo; GONÇALVES, Luiz Fernando. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 203–206, 2008.

FULMER, Gregory R. *et al.* NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. **Organometallics**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 2176–2179, 2010.

GAMBIN, João Pedro Dornelles. **Desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo Fluconazol e timol preparada via técnica de emulsificação espontânea visando aplicação tópica contra cepas de Candida spp.** 2023. 127 f. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, [s. l.], 2023.

GAO, Shanjun *et al.* Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 603858, 2020.

GARCIA, Lana Glerieide Silva *et al.* Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 195, p. 662–669, 2018.

GOSAIN, Ankush; DIPIETRO, Luisa A. Aging and Wound Healing. **World Journal of Surgery**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 321–326, 2004.

GRAVÁN, Pablo *et al.* Lipid-core nanoparticles: Classification, preparation methods, routes of administration and recent advances in cancer treatment. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 314, p. 102871, 2023.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.

HAJJI, Sawssen *et al.* Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 65, p. 298–306, 2014.

HAMA, Rikako *et al.* Recent Tissue Engineering Approaches to Mimicking the Extracellular Matrix Structure for Skin Regeneration. **Biomimetics**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 130, 2023.

HANAN, Muhammad M. *et al.* **Prospects of using Avocado oil for attenuating quorum sensing regulated virulence, bio-filming formation and its antibacterial and antioxidant activities.** [S. l.]: Microbiology, 2018. preprint. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/486928>. Acesso em: 13 jul. 2023.

HASAN, Shameem *et al.* Chitosan Characterization. *In*: HASAN, Shameem *et al.* **Chitin and Chitosan**. Cham: Springer International Publishing, 2022. (Engineering Materials and Processes). p. 51–78. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-01229-7_3. Acesso em: 10 jul. 2023.

HATAMI, Samane; MOHAMADI SANI, Ali; YAVARMANESH, Masoud. Chemical composition and antibacterial activity of organic extra virgin olive oil from Iran. **Nutrition & Food Science**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 388–395, 2016.

JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B. R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 97–111, 2004.

KARTHIK, P.; SARAVANA RAJ, A.; PAVITHRA, J. Natural compound-based interfacial stabilization of nanoemulsions. *In*: BIO-BASED NANOEMULSIONS FOR AGRI-FOOD APPLICATIONS. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 71–89. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323898461000140>. Acesso em: 17 nov. 2023.

KHAMENEH, Bahman *et al.* Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [s. l.], v. 8, p. 118, 2019.

KIATTISIN, Kanokwan *et al.* Preparation and characterization of ultrasound-assisted nanoemulsions containing natural oil for anti-aging effect. **Journal of Agriculture and Food Research**, [s. l.], v. 15, p. 101004, 2024.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 55–76, 2011.

KOLIMI, Praveen *et al.* Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 15, p. 2439, 2022.

KUMARI, Suneeta; KISHOR, Rupak. Chitin and chitosan: origin, properties, and applications. *In*: HANDBOOK OF CHITIN AND CHITOSAN. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 1–33. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128179703000018>. Acesso em: 24 nov. 2022.

LANCIONI, Carlina *et al.* Headspace solid-phase microextraction: Fundamentals and recent advances. **Advances in Sample Preparation**, [s. l.], v. 3, p. 100035, 2022.

LEE, Joseph *et al.* Development of a GC/Q-ToF-MS Method Coupled with Headspace Solid-Phase Microextraction to Evaluate the In Vitro Metabolism of β -Caryophyllene. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 21, p. 7441, 2022.

LI, Aoqi *et al.* Study on TEMPO-Mediated Oxidation of N-Succinyl Chitosan and the Water Retention Property. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 20, p. 4698, 2020.

LIMA, Rita; FERNANDES, Carla; PINTO, Madalena M. M. Molecular modifications, biological activities, and applications of chitosan and derivatives: A recent update. **Chirality**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1166–1190, 2022.

LIU, Yuntao *et al.* Characterization of carboxymethylated polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* and their antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 38, p. 355–362, 2017.

LIU, Qingqing *et al.* Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability and Application in Encapsulation of Bioactive Compounds. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 23, p. 4242, 2019.

LÓPEZ ANGULO, Daniel *et al.* Enhancing Bovine Embryo Development In Vitro Using Oil-in-Water Nanoemulsions as Specific Carriers for Essential Lipids. **BioTech**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 19, 2024.

LUCIANO, Winnie Alencar *et al.* Effect of citral nanoemulsion on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and sensory properties of fresh-cut melon and papaya during storage. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 384, p. 109959, 2023.

LUO, Qiang *et al.* The thiolated chitosan: Synthesis, gelling and antibacterial capability. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 139, p. 521–530, 2019.

MA, Qiumin; DAVIDSON, P. Michael; ZHONG, Qixin. Nanoemulsions of thymol and eugenol co-emulsified by lauric arginate and lecithin. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 206, p. 167–173, 2016.

MAJEWSKA, Ewa *et al.* Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil: Extraction, Composition, Bioactivity and Uses for Food Preservation – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 327–341, 2019.

MARTÍNEZ ÁVILA, Héctor *et al.* Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 17, p. 7423–7435, 2014.

MCCLEMENTS, David J.; JAFARI, Seid Mahdi. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. *In: NANOEMULSIONS*. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 3–20. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128118382000011>. Acesso em: 16 nov. 2022.

MCCLEMENTS, David Julian; JAFARI, Seid Mahdi. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 251, p. 55–79, 2018.

MOBARAK, N.N. *et al.* Conductivity enhancement via chemical modification of chitosan based green polymer electrolyte. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 92, p. 161–167, 2013.

MOHANTY, Chandana; DAS, Manasi; SAHOO, Sanjeeb K. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 2801–2811, 2012.

MOLECULAR WEIGHT BY SINGLE ANGLE DEBEYE PLOT METHOD | MALVERN PANALYTICAL. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/application-notes/an060922molecularweightdetermination>. Acesso em: 11 maio 2024.

MUKARRAM, Mohammad *et al.* Lemongrass Essential Oil Components with Antimicrobial and Anticancer Activities. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 20, 2021.

MUSHTAQ, Abeeda *et al.* Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. **Food Chemistry: X**, [s. l.], v. 18, p. 100684, 2023.

NIRMALA, M. Joyce *et al.* Green nanoemulsions: Components, formulation, techniques of characterization, and applications. *In*: **BIO-BASED NANOEMULSIONS FOR AGRI-FOOD APPLICATIONS**. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 47–69. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323898461000139>. Acesso em: 18 nov. 2023.

NIU, Xiaodi *et al.* An antimicrobial agent prepared by N-succinyl chitosan immobilized lysozyme and its application in strawberry preservation. **Food Control**, [s. l.], v. 108, p. 106829, 2020.

PANDEY, Vikas; KOHLI, Seema. Nanoformulations in Human Health Conditions: The Paradigm Shift. *In*: TALEGAONKAR, Sushama; RAI, Mahendra (org.). **Nanoformulations in Human Health**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 13–42. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-41858-8_2. Acesso em: 16 nov. 2022.

PEREIRA BESERRA, Fernando *et al.* From Inflammation to Cutaneous Repair: Topical Application of Lupeol Improves Skin Wound Healing in Rats by Modulating the Cytokine Levels, NF- κ B, Ki-67, Growth Factor Expression, and Distribution of Collagen Fibers. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 14, p. 4952, 2020.

PHAN, T. T. *et al.* Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. **The Journal of Trauma**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 927–931, 2001.

PITTO-BARRY, Anaïs; BARRY, Nicolas P. E. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 3291–3297, 2014.

PORT, Bianca da Costa Bernardo. **Estudos de formulações com dapsona: caracterização de cristais em géis comerciais e desenvolvimento de nanoemulsões**. 2023. 145 f. [s. l.], 2023.

RASZEWSKA-FAMIELEC, Magdalena; FLIEGER, Jolanta. Nanoparticles for Topical Application in the Treatment of Skin Dysfunctions—An Overview of Dermo-Cosmetic and Dermatological Products. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 24, p. 15980, 2022.

RAUBER, Cristiane da S.; GUTERRES, Sílvia S.; SCHAPOVAL, Elfrides E. S. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 597–601, 2005.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, Melanie *et al.* Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 665–706, 2019.

RUFATO, Késsily B. *et al.* Antimicrobial and cytocompatible chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan, and tanfloc-based polyelectrolyte multilayers on gellan gum films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 183, p. 727–742, 2021.

SAATKAMP, Rodrigo Henrique. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões revestidas por quitosana como carreadores de timol aplicadas a tratamentos de problemas da cavidade oral**. 2019. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, [s. l.], 2019.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y.C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 27, p. 454–459, 2020.

SAHRANESHIN-SAMANI, Fazel *et al.* Regioselective sulfated chitosan produces a biocompatible and antibacterial wound dressing with low inflammatory response. **Biomaterials Advances**, [s. l.], v. 139, p. 213020, 2022.

SÁNCHEZ, Luis-Felipe *et al.* A Simple Approach to Produce Tailor-Made Chitosans with Specific Degrees of Acetylation and Molecular Weights. **Polymers**, [s. l.], v. 13, n. 15, p. 2415, 2021.

SANTOS, Cátia S.C. *et al.* Industrial Applications of Nanoparticles – A Prospective Overview. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 456–465, 2015.

SCHLICHTING, Layla. Relatório de estágio supervisionado desenvolvido na empresa Nanoscopying – Soluções em Nanotecnologia Ltda. [s. l.], 2023.

SEONG, Joon Seob; YUN, Mid Eum; PARK, Soo Nam. Surfactant-stable and pH-sensitive liposomes coated with N-succinyl-chitosan and chitooligosaccharide for delivery of quercetin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 181, p. 659–667, 2018.

SHAN, Yingying *et al.* Preparation of Citral Compound and Its Bamboo Antimildew Properties. **Polymers**, [s. l.], v. 14, n. 21, p. 4691, 2022.

SHIVAKUMAR, Pradeep *et al.* Prospection of chitosan and its derivatives in wound healing: Proof of patent analysis (2010–2020). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 184, p. 701–712, 2021.

SILVA, Henrique; BÁRBARA, Rita. Exploring the Anti-Hypertensive Potential of Lemongrass—A Comprehensive Review. **Biology**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1382, 2022.

SINGH, Yuvraj *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 252, p. 28–49, 2017.

SMYTHE, Paisleigh; WILKINSON, Holly N. The Skin Microbiome: Current Landscape and Future Opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 3950, 2023.

SOLTANZADEH, Maral *et al.* Chitosan nanoparticles encapsulating lemongrass (*Cymbopogon commutatus*) essential oil: Physicochemical, structural, antimicrobial

and in-vitro release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 192, p. 1084–1097, 2021.

SRIMAI, Chadaporn *et al.* Enhancement of Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Properties by N-Succinyl Chitosan and *Mesona chinensis* Extract for Use as Wound Dressings. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 215, p. 113212, 2024.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. **Gene**, [s. l.], v. 569, n. 2, p. 182–190, 2015.

STICKLE, D F. Chapter 4 - Validation, quality control, and compliance practice for mass spectrometry assays in the clinical laboratory. [s. l.],

SUDHAHAR, Varatharajan; KUMAR, Sekar Ashok; VARALAKSHMI, Palaninathan. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. **Life Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 12, p. 1329–1335, 2006.

THAO, N.T. Thu *et al.* Preparation and characterization of succinyl chitosan and succinyl chitosan nanoparticle film: In vitro and in vivo evaluation of wound healing activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 193, p. 1823–1834, 2021.

TOH, Elsie Khai-Woon *et al.* Succinated chitosan as a gene carrier for improved chitosan solubility and gene transfection. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 174–183, 2011.

TRINH, Xuan-Tung *et al.* A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. 9573, 2022.

TUBTIMSRI, Sukannika *et al.* Fabrication and characterization of spearmint oil loaded nanoemulsions as cytotoxic agents against oral cancer cell. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 425–437, 2018.

VAN HOOGEVEST, Peter; FAHR, Alfred. Phospholipids in Cosmetic Carriers. *In*: CORNIER, Jean; KECK, Cornelia M.; VAN DE VOORDE, Marcel (org.). **Nanocosmetics**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 95–140. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-16573-4_6. Acesso em: 6 jul. 2024.

VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VIKHOREVA, G. *et al.* Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 327–332, 2005.

WAISCZIK, Cláudia Honara da Rosa. **Desenvolvimento de membranas bioadesivas de κ-carragenana e hidroxipropilmetilcelulose acetato succinato visando a administração tópica de cloridrato de terbinafina**. 2020. 77 f. - Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2020.

WANYI, Wu *et al.* Comparison of emulsifying characteristics of different macromolecule emulsifiers and their effects on the physical properties of lycopene nanoemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 618–627, 2020.

WEI, Ling *et al.* Possible fungicidal effect of citral on kiwifruit pathogens and their mechanisms of actions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 114, p. 101631, 2021.

WU, Meiyang *et al.* Preparation of N, N, N-trimethyl chitosan via a novel approach using dimethyl carbonate. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 169, p. 83–91, 2017.

XIONG, Wen-yue *et al.* Selective carboxypropionylation of chitosan: synthesis, characterization, blood compatibility, and degradation. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 346, n. 10, p. 1217–1223, 2011.

ZHANG, Chaohong *et al.* Functionalization of carboxymethyl chitosan with chlorogenic acid: preparation, characterization, and antioxidant capacity. **Iranian Polymer Journal**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 81–91, 2021.

ZHAO, Feng *et al.* Perspectives on lecithin from egg yolk: Extraction, physicochemical properties, modification, and applications. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 9, p. 1082671, 2023.

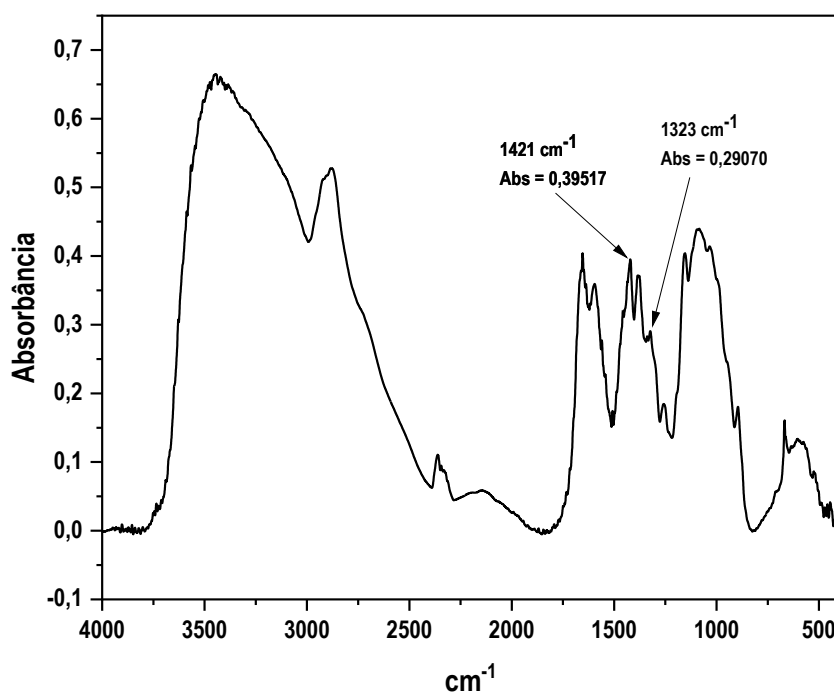
APÊNDICE A: CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA COMERCIAL UTILIZADA

Para a realização da parte experimental do mestrado, foi utilizada uma quitosana comercial derivada de casca de camarão da marca *Sigma-Aldrich* de média massa molar (Lote: BCCG4737).

A.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DO POLÍMERO

Para determinar o grau de desacetilação da quitosana, foi feita a análise por FTIR com pastilha de KBr, onde foi obtido o espectro abaixo (Figura 34):

Figura 34. FTIR da quitosana comercial utilizada.



Para calcular o grau de desacetilação, é feita uma relação entre dois picos de absorção específicos do espectro de infravermelho da quitosana, conforme a equação (Brugnerotto *et al.*, 2001):

Equação 4. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

$$GD\% = 100 - \frac{\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}}\right) - 0,3822}{0,03133}$$

Onde A_{1320} corresponde ao valor de absorvância do pico próximo a 1320 cm^{-1} , que se refere a deformação angular de C-H no anel glicosídico e A_{1420} corresponde ao valor de absorvância do pico próximo a 1420 cm^{-1} referente a deformação angular O-H do grupo hidroxila (Brugnerotto *et al.*, 2001).

Dessa forma, a partir da análise do gráfico de FTIR, há um pico em 1421 cm^{-1} com absorvância de 0,39517 e um pico em 1323 cm^{-1} com absorvância de 0,29070. A partir disso e utilizando a equação mostrada acima, foi encontrado um grau de desacetilação de 88,7% para a quitosana utilizada.

A.2. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA

Para determinação da massa molar do polímero comercial, foi utilizada a técnica de viscosimetria, utilizando um viscosímetro de *Ostwald* acoplado a um banho termostático que manteve a temperatura próxima de 25°C. Com isso, o peso molecular viscosimétrico médio é determinado medindo a viscosidade relativa de soluções tampão formadas com ácido acético/acetato de sódio a várias concentrações do polímero. A massa molar pode ser estimada a partir da viscosidade intrínseca usando a equação de *Mark-Houwink-Sakurada* (Hajji *et al.*, 2014):

Equação 5. Equação de *Mark-Howink-Sakurada*

$$[\eta] = kM_V^a$$

Onde M_V é a massa molar viscosimétrica média do polímero, k e a são constantes que dependem do polímero, dos sistemas de solventes utilizados e da temperatura (Hajji *et al.*, 2014).

A viscosidade intrínseca é dependente do volume hidrodinâmico do polímero, sendo este uma função da interação macromolécula-solvente e da conformação da massa molar no meio. Normalmente as moléculas de polímero assumem agregados ou formas espirais em solução, que conferem resistência à mobilidade impedindo o

fluxo de outras moléculas e conseqüentemente aumentando a viscosidade. (Hasan *et al.*, 2022).

Primeiramente foi feita uma solução estoque de tampão acetato – 0,3 mol/L CH₃COOH e 0,2 mol/L CH₃COONa – que posteriormente foi utilizada para fazer uma solução mãe de quitosana 1,0 g/L. Após isso, foram feitas várias concentrações de polímero, variando de 0,2 g/L até 1,0 g/L. Então foram feitas as medidas no viscosímetro, com triplicata dos tempos de escoamento, como segue abaixo (Tabela 20):

Tabela 20. Dados do experimento utilizando o viscosímetro de *Ostwald*.

Solução	Concentração (g/L)	Tempo médio de escoamento (s)
0 (solvente puro)	0	142,147
1	0,2036	168,21
2	0,4072	192,903
3	0,6108	225,333
4	0,8144	257,84
5	1,018	300,813

A partir desses dados, é possível encontrar os valores de viscosidade relativa (tempo de escoamento das soluções/tempo de escoamento do solvente), viscosidade específica ($1-\eta_{rel}$) e viscosidade reduzida (η_{esp}/C), como segue na Tabela 21:

Tabela 21. Resultados de viscosidade obtidos para as soluções de quitosana.

Solução	η_{rel}	η_{esp}	η_{red} (L/g)
1	1,18336	0,18336	0,90057
2	1,35707	0,35707	0,8769
3	1,58522	0,58522	0,91326
4	1,8139	0,8139	0,99939
5	2,11622	1,11622	1,09648

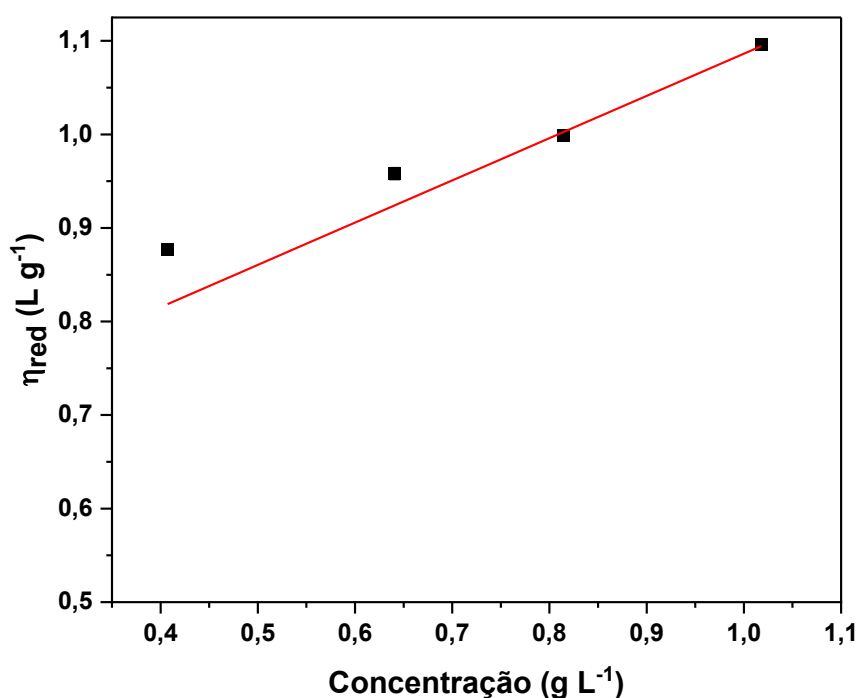
Fazendo uma regressão linear de viscosidade reduzida versus concentração das soluções encontra-se a viscosidade intrínseca extrapolando a reta até zero (Hajji *et al.*, 2014), como segue:

Equação 6. Limite da função de viscosidade reduzida do polímero com a concentração tendendo à zero

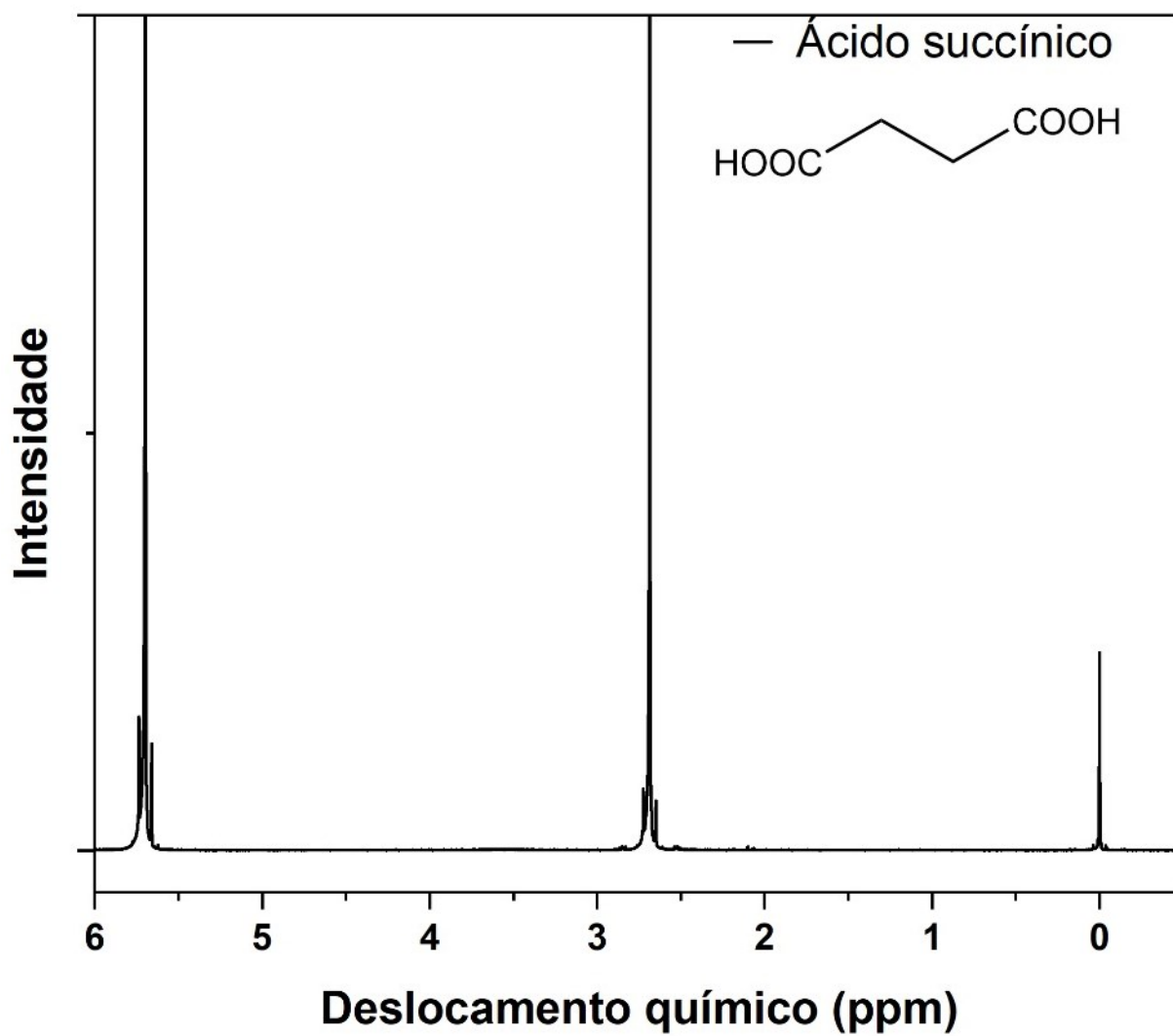
$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{esp}}{C}$$

Com isso, foi feito o gráfico com os dados obtidos (Figura 35).

Figura 35. Regressão linear com os dados de viscosidade

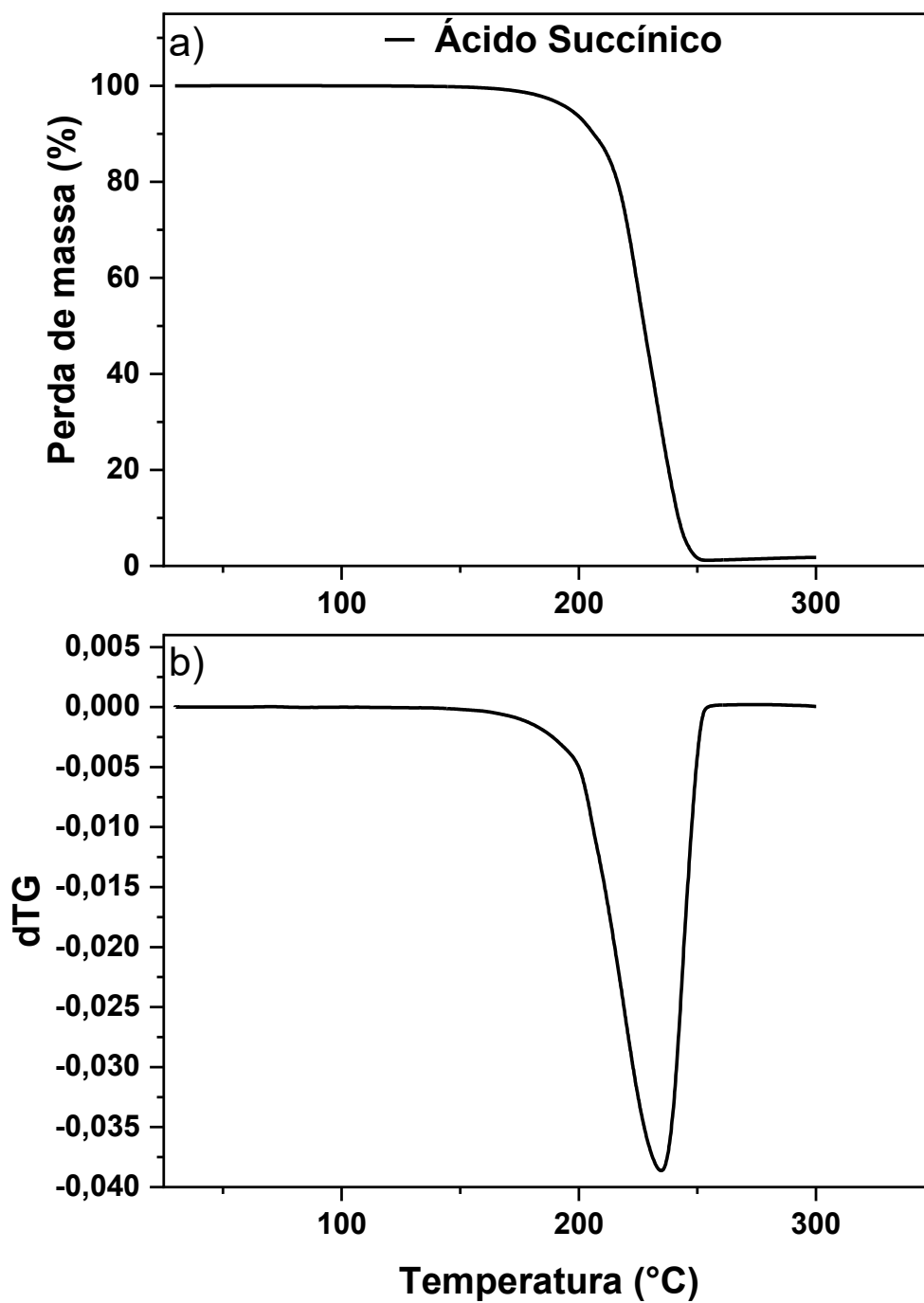


Aplicando o limite de concentração indo até zero, foi encontrado um valor de $0,63472 \pm 0,0353 \text{ L.g}^{-1}$ para a viscosidade intrínseca da solução de quitosana analisada. Aplicando o valor na equação de *Mark-Houwink-Sakurada* e utilizando como parâmetros (Hasan *et al.*, 2022): $k = 0,076 \text{ mL.g}^{-1}$ e $a = 0,76$ para o sistema tampão acetato utilizado, foi encontrado um valor de $M_v = 14,5 \pm 0,3 \times 10^4$ para a massa molar viscosimétrica média da quitosana em questão. O valor está coerente com a faixa de massa molar onde se encontram as quitosanas de média massa molar, que vai de 100 a 250 kg.mol^{-1} (Garcia *et al.*, 2018).

APÊNDICE B: RMN DE ^1H DO ÁCIDO SUCCÍNICOFigura 36. RMN de ^1H do ácido succínico em solvente: D_2O e $\text{C}_2\text{DF}_3\text{O}_2$ (80/20 v/v).

APÊNDICE C: TG DO ÁCIDO SUCCÍNICO

Figura 37. Análise termogravimétrica (a) TG e (b) dTG do ácido succínico.



APÊNDICE D: ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO PARA O CITRAL PURO

A partir da análise do citral puro, foi obtido um cromatograma (Figura 26) com dois picos característicos dos isômeros cis e trans que compõem o citral (Tabela 22):

Tabela 22. Dados cromatográficos do citral puro obtidos por GCMS.

Pico	T.R. (min)	Área	Área (%)	Nome
1	12,908	7897699	42,60	Neral/cis-citral (96% similaridade)
2	13,727	10641901	57,40	Geranial/trans-citral (95% similaridade)

A partir dos picos e utilizando o detector de massas com modo varredura (m/z) foram obtidos os espectros dos picos 1 (Figura 38) e 2 (Figura 39), referentes ao neral e geranial respectivamente:

Figura 38. Espectro de massas do Neral (cis-citral).

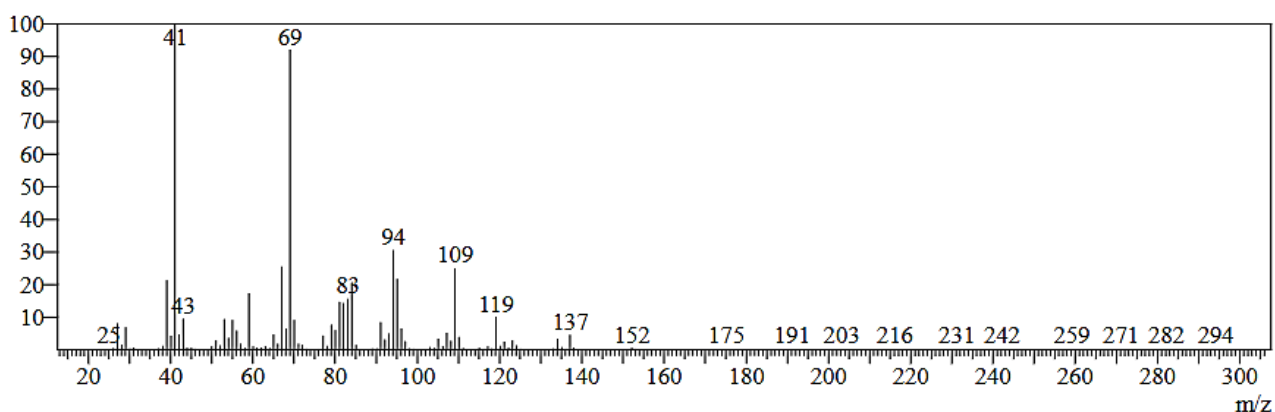
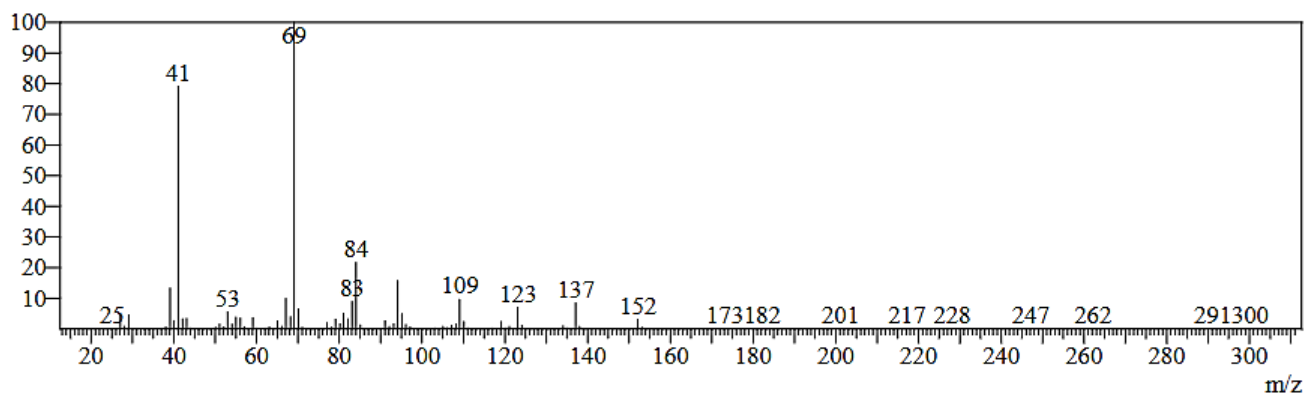


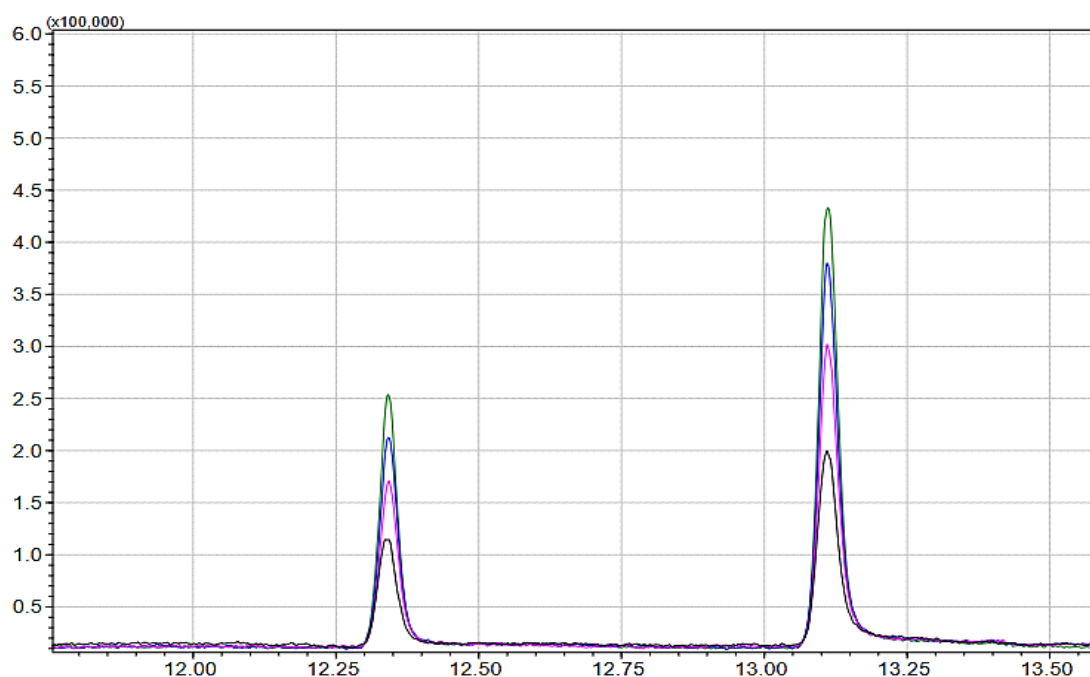
Figura 39. Espectro de massas do Geranial (trans-citral).



APÊNDICE E: CROMATOGRAMAS E VALORES DE ÁREAS DE PICOS UTILIZADOS PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO CITRAL POR HS-SPME GCMS

Após desenvolvimento e otimização do método utilizando HS-SPME descrito em 4.3.2.3, a curva de calibração foi feita a partir de 4 soluções de citral em matriz NEB, que foram extraídas e lidas em triplicata pelo método para se obter a validação do mesmo. A sobreposição dos cromatogramas referentes as concentrações usadas ajudaram a elucidar a linearidade do método (Figura 40).

Figura 40. Cromatogramas sobrepostos utilizados para desenvolver a curva de calibração de citral em matriz NEB, onde (—) 172 mg L⁻¹, (—) 240 mg L⁻¹, (—) 316 mg L⁻¹, (—) 372 mg L⁻¹ de citral nos quatro pontos respectivamente.



A partir das triplicatas, que ficaram com um perfil muito similar ao da figura 40, os dados foram tratados para se obter os valores de área de cada pico (Neral e Geranial) e assim somar para ter a área total (citral), resultados que estão apresentados na Tabela 23. A partir desta tabela foram feitas as médias das áreas de pico e seus respectivos desvios, resultados estes apresentados na tabela 14.

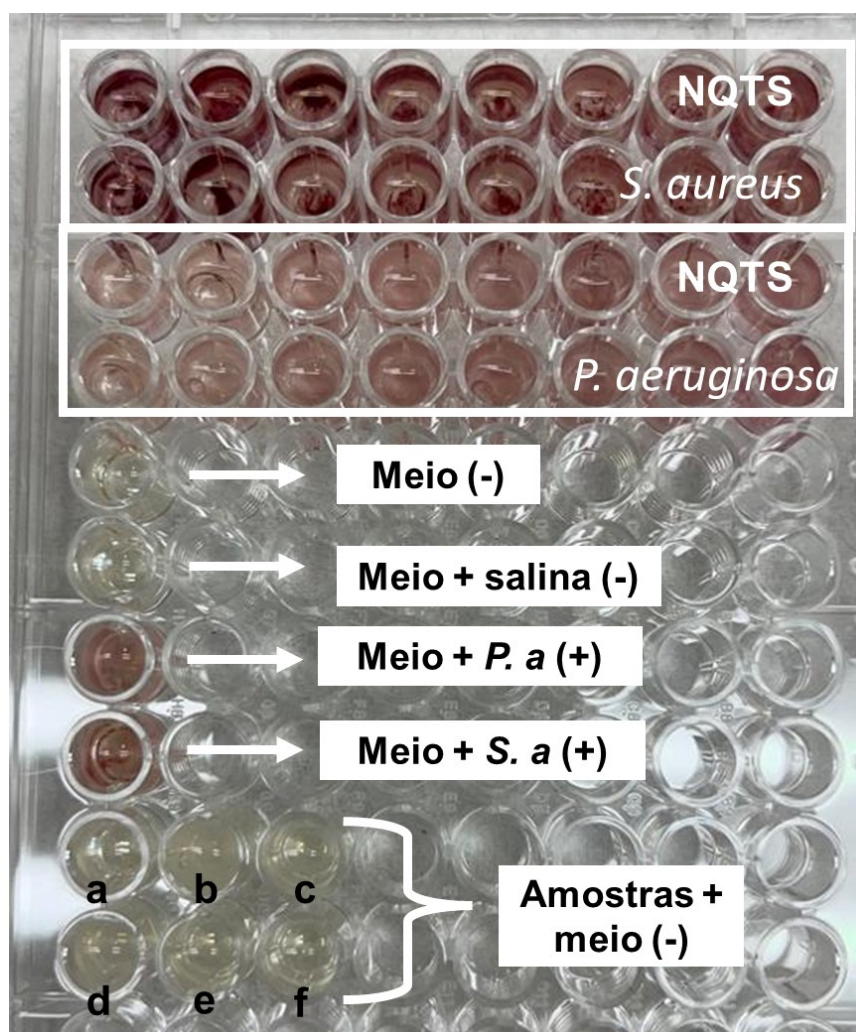
Tabela 23. Dados utilizados para construção da curva de calibração do citral em matriz NEB.

Citral mg	Concentração mg L ⁻¹	Área de pico			Duplicata			Triplicata		
		Neral	Geranial	Soma	Neral	Geranial	Soma	Neral	Geranial	Soma
4,3	172	242115	475798	717913	242319	460942	703261	334453	661212	995665
6	240	363230	701143	1064373	331424	650435	981859	335337	634945	970282
7,9	316	450227	861179	1311406	426543	798741	1225284	415283	806307	1221590
9,3	372	532541	1003302	1535843	507643	976992	1484635	507643	976992	1484635

APÊNDICE F: CONTROLES UTILIZADOS NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

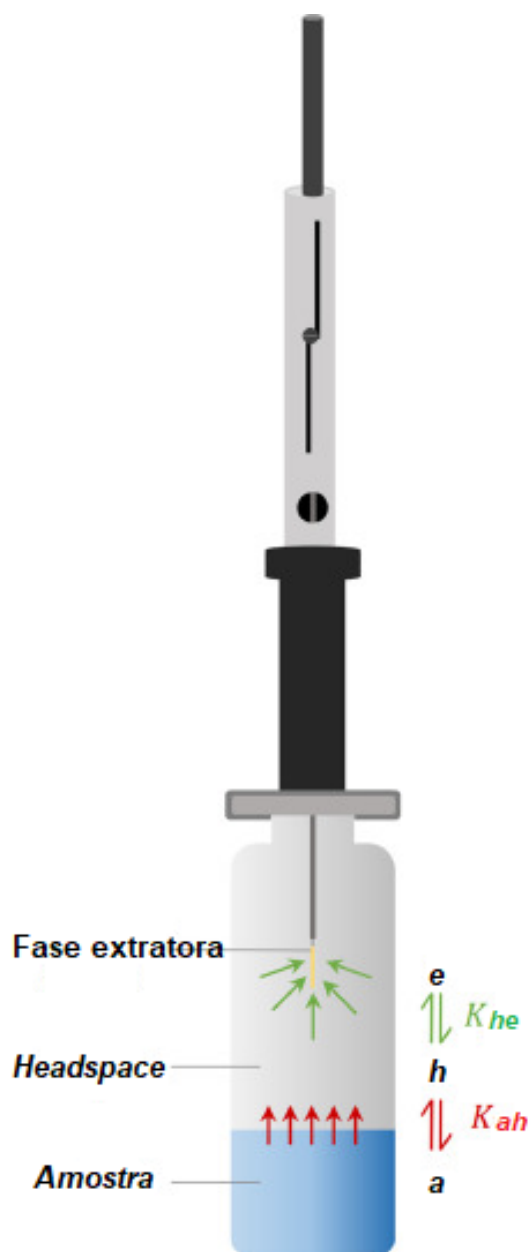
A comparação com os controles é uma garantia de que o teste não teve interferência de algum micro-organismo externo. Na Figura 42 estão apresentados os ensaios de atividade antibacteriana realizados apenas com a solução do polímero, onde é possível dizer que não houve atividade pois teve crescimento bacteriano em todos os pocinhos, porém a concentração inicial utilizada foi de 0,2% (m/v), correspondente a concentração de polímero nas formulações revestidas.

Figura 41. Ensaio de atividade antibacteriana com a NQTS e controles negativos e positivos para comparação. Nos controles negativos as amostras ali são a) Citral puro, b) NEB, c) NEC, d) NEB@NQTS, e) NEC@NQTS e f) NQTS.



ANEXO A: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA POR HEADSPACE (HS-SPME)

Figura 42. Esquema representando o processo de HS-SPME com os equilíbrios envolvidos.



Fonte: Adaptado de Lancioni *et al.*, (2022).