



## INCORPORAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM BIOFILMES.

Giovanna O. Araújo, Natália C. de A. Ferreira, Carolina S. F. Picone.

### Resumo

Este projeto teve como objetivo desenvolver um filme biodegradável a base de zeína (Z) e quitosana (CS), incorporado com óleo essencial de orégano (OEO) livre e nanoencapsulado, de modo a avaliar a influência da adição de novos compostos nas propriedades do filme. Os resultados mostram que a adição do óleo essencial de orégano livre resultou em filmes mais rígidos, com superfícies mais homogênea, porém com maior molhabilidade.

### Palavras-chave:

Filme biodegradável, zeína, óleo essencial de orégano.

### Introdução

A zeína é uma proteína derivada do endosperma dos grãos de milho, que vem sendo recentemente utilizada para elaboração de filmes com melhor permeabilidade e resistência térmica<sup>[1],[2]</sup>. A quitosana também pode ser utilizada como agente filmogênico agregando propriedades antioxidantes, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana aos filmes<sup>[3],[4],[5],[6]</sup>. A agregação de óleos essenciais com reconhecida ação antimicrobiana também pode conferir maior funcionalidade aos filmes<sup>[7],[8]</sup>, porém pode ocasionar alteração de outras características relevantes como mudanças de propriedades mecânicas e permeabilidade a gases, afetando sua aplicação.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um filme biodegradável a base de zeína e quitosana, incorporado com óleo essencial de orégano livre e nanoencapsulado, de modo a avaliar a influência da adição de novos compostos nas propriedades do filme.

### Materiais e Métodos

#### Materiais

Foram utilizadas como agentes formadores de filme a zeína (Z), oriunda de milho (cod.Z3625, Sigma-Aldrich, EUA), quitosana (CS) de baixo peso molecular (cod.448869, Sigma-Aldrich, EUA), óleo essencial de orégano (OEO) (Ferquima, Moldávia) e glicerina P.A (Sinergia, Brasil). Os demais reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico.

#### Métodos

Os agentes filmogênicos (quitosana e zeína) foram caracterizados quanto à composição centesimal. Os filmes foram obtidos de acordo com metodologia descrita por Zhang *et al.* (2019) com pequenas modificações. Após essa etapa, os filmes foram elaborados seguindo 4 diferentes proporções e, então caracterizados frente a sua gramatura e espessura, bem como foram avaliados quanto às propriedades mecânicas, seguido da caracterização dos traços dos elementos presentes na amostra (Espectroscopia no infravermelho - FTIR), análises topográficas (Microscopia eletrônica de varredura – MEV), além do estudo de seu potencial de molhabilidade (Ângulo de contato).

Foram preparados filmes com quatro diferentes composições de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1.** Proporções de zeína (Z), quitosana (CS), óleo essencial de orégano (OEO) e glicerol utilizados para composição das soluções filmogênicas.

Amostra	CS:Z	CS (%)	Z (%)	OEO (%)	Glicerina (%)
1CS:1Z	1:1	2,0	2,0	-	0,6
3CS:1Z	3:1	2,0	2,0	-	0,6
1CS:1Z:2OEO	1:1	2,0	2,0	2,0	0,6
3CS:1Z:2OEO	3:1	2,0	2,0	2,0	0,6

A fim de determinar uma quantidade de solução a ser acondicionada nas placas foram realizados ensaios prévios de gramatura. Para isso foram realizadas análises com 5 diferentes gramaturas em cada filme de maneira a obter uma espessura que variasse entre 0,04 – 0,06 mm (ZHANG *et al.*, 2019).

Os filmes controles (sem óleo) e os filmes incorporados com óleo essencial de orégano livre foram avaliados quanto às propriedades mecânicas, espectro químico (Espectroscopia no infravermelho - FTIR), morfologia (Microscopia eletrônica de varredura – MEV), além do potencial de molhabilidade (Ângulo de contato).

## Resultados e Discussão

### Composição centesimal

A composição centesimal da zeína e quitosana é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição centesimal da amostra de zeína (Z) e quitosana (CS).

	Proteína (%)	N-quitosana (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	Gordura (%)
Quitosana	-	89,031±0,046	0,407±0,005	5,370±0,206	0,282±0,006
Zeína	79,938±0,289	-	1,126±0,080	1,515±0,100	5,951±0,509

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que a amostra de zeína apresenta alto teor de proteína, visto que é uma proteína obtida do endosperma do milho, bem como, seu teor de gordura se destacou por ser mais alto em comparação com a amostra de quitosana. Outro ponto que se destaca é a alta proporção de umidade da quitosana quando comparada com a zeína.

### Gramatura

A fim de determinar uma quantidade de solução a ser utilizada para formação de cada filme foram realizados ensaios prévios de gramatura. Os resultados de espessura média e variância são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Espessura média (MED) e coeficiente de variação (CV) obtida a partir da análise de gramatura dos filmes.

Amostra	Gramatura (g/cm <sup>2</sup> )									
	0,12		0,15		0,18		0,20		0,22	
	Espessura (mm)									
	MED	CV	MED	CV	MED	CV	MED	CV	MED	CV
1CS:1Z	0,026 <sup>a</sup>	2,132	0,031 <sup>a</sup>	0,918	0,038 <sup>a</sup>	0,653	0,046 <sup>a</sup>	0,355	0,049 <sup>a</sup>	1,034
3CS:1Z	0,032 <sup>a</sup>	1,372	0,037 <sup>a</sup>	1,162	0,039 <sup>a</sup>	0,731	0,040 <sup>a</sup>	0,727	0,045 <sup>a</sup>	0,665
1CS:1Z:2OEO	0,032 <sup>a</sup>	0,601	0,046 <sup>a</sup>	0,554	0,048 <sup>a</sup>	0,495	0,063 <sup>a</sup>	0,514	0,075 <sup>a</sup>	0,466
3CS:1Z:2OEO	0,034 <sup>a</sup>	1,438	0,045 <sup>a</sup>	0,578	0,056 <sup>a</sup>	0,408	0,060 <sup>a</sup>	1,213	0,066 <sup>a</sup>	0,360

\*Na mesma coluna as médias com letras diferentes se diferem estatisticamente ( $p < 0.05$ ).

A gramatura que mais se aproximou da desejada (entre 0,04 – 0,06 mm<sup>[9]</sup>) foi a equivalente à 0,18 g/cm<sup>2</sup>, essa gramatura também apresentou baixo coeficiente de variação., por isso foi a escolhida para formação dos filmes para as demais análises.

### Propriedades mecânicas

Os resultados de valores de espessura, tensão na ruptura (TS), módulo elástico (E) e a deformação na ruptura ( $\epsilon$ ) são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Espessura e propriedades mecânicas dos filmes de quitosana (CS) e zeína (Z) adicionados ou não de óleo essencial (OEO).

Amostra	Espessura (mm)	TS (MPa)	E (MPa)	$\epsilon$ (-)
1CS:1Z	0,046±0,007 <sup>a</sup>	19,65±0,74 <sup>a</sup>	3,26±0,44 <sup>a</sup>	6,14±0,65 <sup>a</sup>
3CS:1Z	0,048±0,007 <sup>a</sup>	18,99±3,42 <sup>a</sup>	2,17±0,28 <sup>a</sup>	9,06±0,77 <sup>b</sup>
1CS:1Z:2OEO	0,046±0,007 <sup>a</sup>	14,49±1,01 <sup>a</sup>	8,05±2,56 <sup>b</sup>	1,63±1,03 <sup>c</sup>
3CS:1Z:2OEO	0,050±0,008 <sup>a</sup>	25,25±4,59 <sup>b</sup>	4,14±0,79 <sup>a</sup>	6,09±0,22 <sup>a</sup>

\*Na mesma coluna as médias com letras diferentes se diferem estatisticamente ( $p < 0.05$ ).

Nas amostras com ausência de óleo essencial de orégano (1CS:1Z e 3CS:1Z) a variação da proporção de quitosana não gerou mudança significativa no valor da tensão. Porém observa-se que quando há a adição do óleo essencial (1CS:1Z:2OEO e 3CS:1Z:2OEO) a proporção da quitosana se torna relevante, uma vez que quanto maior sua quantidade, maior foi a dureza do filme analisado. A adição de óleo essencial de orégano resultou em maiores valores de módulo elástico quando comparado com as demais amostras indicando assim, uma maior rigidez. Quanto

à deformação dos filmes, a maior adição de quitosana (3CS:1Z e 3CS:1Z:2OEO) resultou em maior deformação na ruptura.

### Ângulo de contato

Para determinação da hidrofiliicidade de cada material estudado, avaliou-se o ângulo de contato médio de cada amostra. Os valores encontrados são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Ângulo de contato médio dos filmes em água.

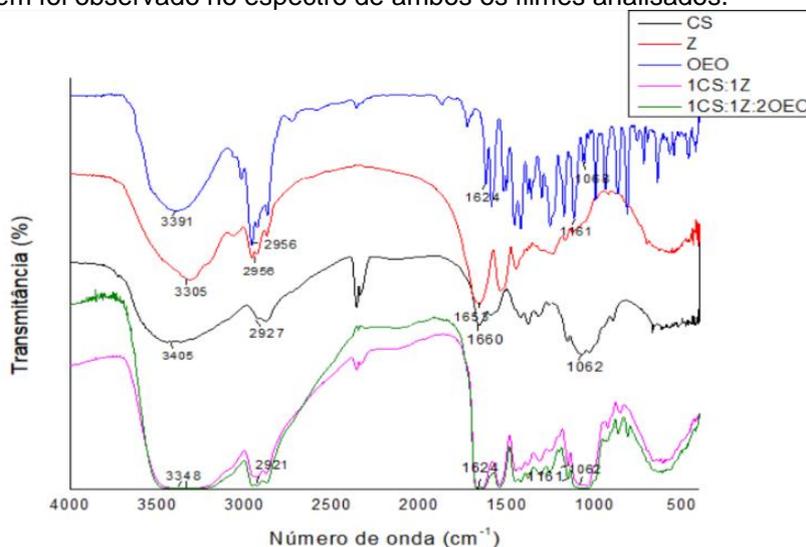
Tempo (s)	Ângulo de contato (°)			
	1CS:1Z	3CS:1Z	1CS:1Z:2OEO	3CS:1Z:2OEO
0	69,8 <sup>Aa</sup>	67,5 <sup>Aa</sup>	53,7 <sup>Aa</sup>	62,6 <sup>Aa</sup>
30	67,3 <sup>Aa</sup>	66,4 <sup>Aa</sup>	52,8 <sup>Ab</sup>	60,7 <sup>Aab</sup>
60	63,9 <sup>Aa</sup>	66,7 <sup>Aa</sup>	51,4 <sup>Aa</sup>	59,4 <sup>Aa</sup>

\*Na mesma linha valores com letras diferentes se diferem estatisticamente ( $p < 0.05$ ).

Pôde-se notar que a amostra com maior concentração de quitosana e ausência de óleo essencial (3CS:1Z) revelou um menor ângulo de contato, o que indica uma maior molhabilidade. Além disso, a amostra com maior proporção de quitosana e presença de óleo essencial de orégano (3CS:1Z:2OEO) mostrou ser menos hidrofílica quando comparada com a amostra com menor proporção de quitosana e adição do óleo (1CS:1Z:2OEO).

### Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

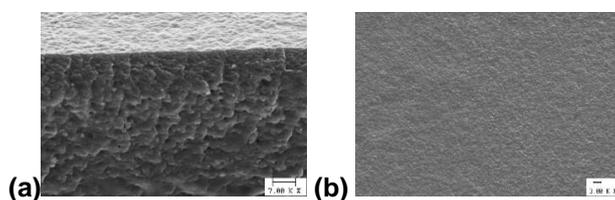
De acordo com a Figura 1 todas as amostras exibiram picos característicos 3305 e 3405  $\text{cm}^{-1}$  relativos ao alongamento de vibração das ligações de O-H e N-H. De maneira geral os filmes formados exibiram picos muito semelhantes entre si. O óleo essencial de orégano apresentou maior número de picos devido à complexidade de sua composição, com uma variedade de ligações químicas, principalmente devido aos anéis aromáticos. Os picos entre 2921-2956  $\text{cm}^{-1}$  e 1621-1660  $\text{cm}^{-1}$  observados no espectro de todas as amostras são atribuídos ao alongamento da ligação C-H e no de C-O<sup>[10],[11]</sup>. As bandas entre 1062-1168  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas ao alongamento da ligação C-O e foi muito evidente no espectro da quitosana bem como nas duas amostras de filme. Em relação ao pico 1161  $\text{cm}^{-1}$ , é resultante ao alongamento de C-O em C-O-C e foi mais explícito no espectro do óleo essencial de orégano, e consequentemente também foi observado no espectro de ambos os filmes analisados.

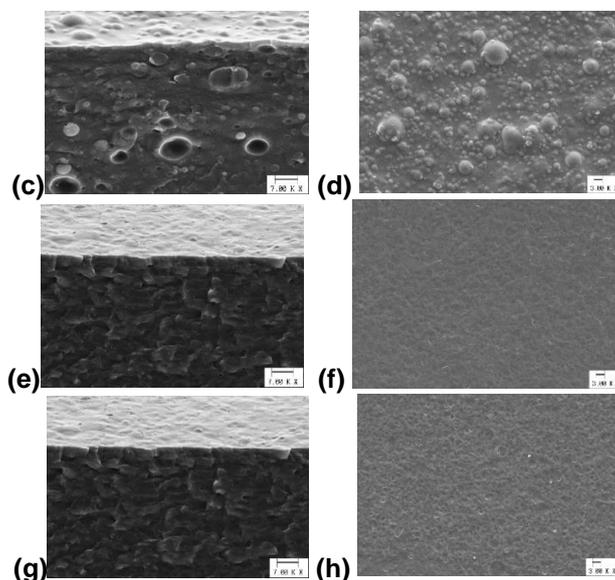


**Figura 1.** Análise de espectro de infravermelho (FTIR) das amostras.

### Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície e área de seção transversal dos filmes é apresentada na Figura 2.





**Figura 2.** Morfologia dos filmes onde são apresentadas à esquerda as áreas de seção transversal e à direita são apresentadas as superfícies de cada filme de diferentes composições: (a) e (b) amostra 1CS:1Z, (c) e (d) 3CS:1Z, (e) e (f) CS:1Z:2OEO e (g) e (h) 3CS:1Z:2OEO.

Foi possível observar que o filme com maior proporção de quitosana e ausência de OEO (3CS:1Z) apresentou uma superfície menos lisa e desigual, provavelmente devido à formação de aglomerados de quitosana presentes no filme. De forma contrária, foi observado que o filme que continha em sua composição óleo essencial e alta quantidade de quitosana (3CS:1Z:2OEO) apresentou uma superfície homogênea. Portanto, a interação do óleo essencial de orégano com a quitosana diminuiu a formação de aglomerados e promoveu uma superfície mais lisa. Verificou-se também que, as amostras com adição de óleo essencial de orégano (1CS:1Z:2OEO e 3CS:1Z:2OEO) exibiram superfícies com concavidades esféricas que possivelmente são referentes ao óleo que foi evaporado durante o processo de preparo das amostras. Tais amostras também apresentaram uma estrutura interna menos compacta e mais porosa compatível com a maior rigidez e menor deformabilidade observada nos ensaios de propriedades mecânicas.

### Conclusões

Concluiu-se que a adição de óleo essencial de orégano ocasiona o aumento da rigidez e molhabilidade de filmes de quitosana e zeína. Em contrapartida, na ausência de óleo essencial os filmes apresentaram maior rugosidade superficial. Ademais, a maior proporção de quitosana resultou em elevação na deformação na ruptura dos filmes.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao PIBIC/CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro.

[1] GHANBARZADEH, B. & OROMIEHI, A.R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 43, n. 2, p. 209-215, 2008.

[2] TIHMINLIOGLU, F., ATIK, I.D., ÖZEN, B. Water vapor and oxygen-barrier performance of corn-zein coated polypropylene films, *Journal of Food Engineering*. v.96, n.3, p.342-347, 2010.

[3] LI P., POON Y., LI W., ZHU H., YEAP S.H., CAO Y., Qi W., ZHOU C., LAMRANI M., BEUERMAN R.W., Kang E.T., Mu Y., Li C.M., CHANG M.W., JAN LEONG S.S, CHANPARK M.B. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nature Materials*. v. 10, p. 149-156, 2010

[4] YAN W., CHEN W., MUHAMMAD U., ZHANG J., ZHUANG J., ZHOU G. Preparation of  $\alpha$ -tocopherol-chitosan nanoparticles/chitosan/montmorillonite film and the antioxidant efficiency on sliced dry-cured ham. *Food Control*. v.104, pp. 132-138, 2019.

[5] HAMDI M., NASRI R., HAJJI S., NIGEN M., Li S., NASRI M. Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties. *Food Hydrocolloids*. v. 87, pp. 48-60, 2019.

[6] WANG H., GONG X., MIAO Y., GUO X., LIU C., FAN Y.Y., ZHANG J., NIU B., Li W. Preparation and characterization of multilayer films composed of chitosan, sodium alginate and carboxymethyl chitosan-ZnO nanoparticles. *Food Chemistry*. v. 283, pp. 397-403, 2019.

[7] VAN VURREN S.F., TOIT L.C., PARRY A., PILLAV V., CHOONARA Y.E. Encapsulation of essential oils within a polymeric liposomal formulation for enhancement of antimicrobial efficacy. *Natural Product Communication*. v.5, n.9 p.1401-1408, 2010.

[8] WEISS, J., LOEFFLER, M., TERJUNG, N. The antimicrobial paradox: why preservatives lose activity in foods. *Current Opinion in Food Science*. v.4, p.69-75, 2015

efficiency on sliced dry-cured ham. *Food Control*. v.104, pp. 132-138, 2019. [9] ZHANG, L., LIU, Z., HAN, X., SUN, Y., WANG, X. Effect of ethanol content on rheology of film-forming solutions and properties of zein/chitosan film. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.134, p.807-814, 2019.

[10] XU, Y.X., KIM, K.M., HANNA, M.A., NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*. v.21, p.185-192, 2005.

<sup>[11]</sup> HAN, D.L., YAN, L.F., CHEN, W.F., LI, W. Preparation of chitosan/graphene oxide composite film with enhanced mechanical strength in the wet state. Carbohydrate Polymers. v.83, p.653-658, 2011.