

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE FILMES COMPOSTOS DE QUITOSANA E ALGINATO  
CONTENDO FOLHAS DE ORÉGANO OU ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
PARA APLICAÇÃO COMO CURATIVO

ANDRESSA DE ESPÍNDOLA SOBCZYK

Porto Alegre

2020

ANDRESSA DE ESPÍNDOLA SOBCZYK

DESENVOLVIMENTO DE FILMES COMPOSTOS DE QUITOSANA E ALGINATO  
CONTENDO FOLHAS DE ORÉGANO OU ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
PARA APLICAÇÃO COMO CURATIVO

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Cristina Tessaro  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Jung Luvizetto Faccin

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Desenvolvimento de filmes compostos de quitosana e alginato contendo folhas de orégano ou óleo essencial de orégano para aplicação como curativo*, elaborada por Andressa de Espíndola Sobczyk, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Data de aprovação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Michele Duarte Soares – IQ/UFRGS

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Misturini Rossi – DEQUI/UFRGS

---

Dr.<sup>a</sup> Patrícia Benelli – Pesquisadora PPGEQ/UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ser maravilhoso e presente em minha vida, por me dar a provisão necessária para buscar meus objetivos, por ser minha fortaleza.

À minha família, a qual amo incondicionalmente, por me apoiarem e me compreenderem nos momentos difíceis. À minha avó Carmita Espíndola, por estar ao meu lado sempre e ser o meu porto seguro, pelo abraço com poder calmante, pelo seu amor infinito e por ser minha inspiração. Ao meu pai Mário Sobczyk, por ser o meu exemplo de estudo e de profissional, por acreditar e investir em mim.

Ao meu namorado, Béuren Bechlin, por sua paciência sem fim, por me incentivar a fazer sempre o meu melhor, pelo carinho e por me fazer sorrir todos os dias, por caminhar ao meu lado nessa jornada chamada vida.

Aos meus amigos, por compartilharem comigo todos os momentos, por tornarem meus dias mais leves e felizes. Especialmente agradeço ao meu amigo Lucas Schindel por me dar seu constante apoio, por me ajudar incansavelmente ao longo deste trabalho (e ao longo da vida também), por me dar a oportunidade de te chamar de AMIGO (sim, com todas as letras maiúsculas, apenas a primeira não seria suficiente).

Aos meus queridos colegas de laboratório, por estarem sempre dispostos a ouvir e ajudar, por serem essa equipe incrível. Agradeço especialmente à Cláudia Luchese pela ajuda e pelas inúmeras contribuições neste estudo.

Às minhas queridas orientadora e coorientadora, Isabel Cristina Tessaro e Débora Jung Luvizetto Faccin, pelos ensinamentos e pelo suporte, pela atenção, interesse e palavras de encorajamento.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPERGS pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Os biopolímeros de fontes renováveis estão ganhando destaque na medicina pois, devido às suas propriedades, podem atuar como substituintes parciais de alguns materiais sintéticos não biodegradáveis. Para aplicações tais como curativos, a incorporação de compostos bioativos com propriedades antimicrobianas em matrizes poliméricas pode proteger e acelerar processos de cicatrização e, entre as substâncias que apresentam esses compostos, destacam-se os óleos essenciais. Com o intuito de diminuir os custos envolvidos no processo, a utilização de compostos priori à extração do óleo apresenta-se como uma alternativa vantajosa. O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento e na caracterização de filmes compostos de quitosana e alginato contendo folhas de orégano cominuídas (OR) ou óleo essencial de orégano (OEO) como agentes antimicrobianos para aplicação como curativo. Filmes de quitosana e alginato (1:1), contendo OEO, nas concentrações de 0,25 % e 0,5 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{suspensão}}$ ), e contendo OR, nas concentrações de 10 % e 20 % ( $m_{\text{orégano}}/m_{\text{polímero}}$ ), foram produzidos por *casting* e caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, de barreira e fatores antimicrobianos (atividade de água e inibição de crescimento bacteriano). De forma geral, os filmes obtidos apresentaram propriedades que estão de acordo com algumas das principais características desejadas em curativos, com fluxo de vapor de água inferior a  $35 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , capacidade de absorção de líquidos (água destilada e solução salina) moderada e propriedades mecânicas, exceto tensão de ruptura, próximas às da pele humana. Todos os filmes apresentaram valores de atividade de água abaixo do limite mínimo para o crescimento de microrganismos. A incorporação de OEO ou de OR aumentou a atividade antimicrobiana do material em comparação ao controle (contendo apenas os biopolímeros). Os filmes contendo OEO apresentaram as maiores zonas de inibição, evidenciando a maior eficiência do óleo como agente antibacteriano. Contudo, o OR também foi capaz de aumentar a atividade antibacteriana dos filmes, mesmo com baixas concentrações dos componentes bioativos na estrutura filmogênica, indicando seu potencial de utilização sem a extração prévia do óleo. Os resultados obtidos demonstram que os filmes desenvolvidos apresentam potencial para utilização como curativos antimicrobianos, apresentando características oclusivas e drenagem moderada de exsudatos, sendo capazes de manter um ambiente adequado à cicatrização.

**Palavras-chave:** biopolímeros, filmes ativos, orégano, curativos, *casting*

## ABSTRACT

Biopolymers from renewable sources are gaining prominence in medicine because, due to their properties, they can act as partial substitutes for some non-biodegradable synthetic materials. For applications such as dressings, the incorporation of bioactive compounds with antimicrobial properties in polymeric matrices can protect and accelerate healing processes and, among the substances that contain these compounds, essential oils stand out. To reduce the costs involved in the process, the use of compounds before the extraction of the oil presents itself as an advantageous alternative. The aim of this work is the development and characterization of films composed of chitosan and alginate containing comminuted oregano leaves (OR) or essential oil of oregano (OEO) as antimicrobial agents for application as a dressing. Chitosan and alginate films (1:1), containing OEO, in concentrations of 0.25 % and 0.5 % ( $m_{\text{oil}}/m_{\text{suspension}}$ ), and containing OR, in concentrations of 10 % and 20 % ( $m_{\text{oregano}}/m_{\text{polymer}}$ ), were produced by casting and characterized as to their physical-chemical, barrier and antimicrobial properties (water activity and inhibition of bacterial growth). In general, the films obtained showed properties that are in accordance with some of the main characteristics desired in dressings, with water vapor flow below  $35 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , moderate liquid absorption capacity (distilled water and saline solution) and mechanical properties, except tensile strength, close to those of human skin. All films showed water activity values below the minimum limit for the growth of microorganisms. The incorporation of OEO or OR increased the antimicrobial activity of the material compared to the control (containing only biopolymers). The films containing OEO showed the highest zones of inhibition, showing the greater efficiency of the oil as an antibacterial agent. However, OR was also able to increase the antibacterial activity of the films, even with low concentrations of bioactive components in the structure, indicating its potential for use without prior oil extraction. The results obtained demonstrate that the films developed have the potential for use as antimicrobial dressings, presenting occlusive characteristics and moderate drainage of exudates, being able to maintain an adequate environment for healing.

**Keywords:** biopolymers, active films, oregano, dressings, casting

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVO GERAL	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
2.1	CURATIVOS	17
2.2	BIOPOLÍMEROS PARA PRODUÇÃO DE CURATIVOS	19
<b>2.2.1</b>	<b>Quitosana</b>	<b>21</b>
2.2.1.1	Solubilidade e estruturas formadas da quitosana	23
2.2.1.2	Filmes de quitosana	24
2.2.1.3	Aplicação da quitosana em curativos	26
<b>2.2.2</b>	<b>Alginato</b>	<b>26</b>
2.2.2.1	Solubilidade do alginato	29
2.2.2.2	Reticulação e formação de gel	29
2.2.2.3	Aplicação de alginato em curativos	31
<b>2.2.3</b>	<b>Filmes compostos de quitosana e alginato</b>	<b>32</b>
2.2.3.1	Complexos de polieletrólitos (PECs)	32
2.2.3.2	Condições de processamento para obtenção de filmes de PECs	33
<b>2.2.4</b>	<b>Técnicas de produção de filmes</b>	<b>34</b>
2.3	FILMES ATIVOS PARA CURATIVOS	35
<b>2.3.1</b>	<b>Curativos antimicrobianos</b>	<b>35</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Óleos essenciais</b>	<b>37</b>
2.3.2.1	Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> L.) e óleo essencial de orégano	39
2.3.2.2	Dispersão de óleos essenciais em matrizes poliméricas	42
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>

3.1	MATERIAIS .....	46
3.1.1	<b>Biopolímeros: quitosana e alginato.....</b>	<b>46</b>
3.1.2	<b>Agentes antimicrobianos .....</b>	<b>46</b>
3.1.3	<b>Reagentes.....</b>	<b>46</b>
3.1.4	<b>Caracterização dos biopolímeros e agentes antimicrobianos.....</b>	<b>46</b>
3.1.4.1	Estrutura química.....	47
3.1.4.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	47
3.2	OBTENÇÃO DOS FILMES .....	47
3.2.1	<b>Solubilização dos biopolímeros .....</b>	<b>47</b>
3.2.2	<b>Filmes compostos de quitosana e alginato .....</b>	<b>48</b>
3.2.3	<b>Preparação dos filmes compostos de quitosana e alginato contendo óleo essencial de orégano .....</b>	<b>49</b>
3.2.4	<b>Preparação dos filmes compostos de quitosana e alginato contendo orégano .....</b>	<b>50</b>
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES .....	51
3.3.1	<b>Aspecto visual e morfologia .....</b>	<b>51</b>
3.3.2	<b>Espessura.....</b>	<b>51</b>
3.3.3	<b>Grau de inchamento.....</b>	<b>51</b>
3.3.4	<b>Propriedades ópticas e proteção UV.....</b>	<b>52</b>
3.3.5	<b>Estrutura química.....</b>	<b>53</b>
3.3.6	<b>Análise termogravimétrica (TGA) .....</b>	<b>53</b>
3.3.7	<b>Propriedades mecânicas .....</b>	<b>53</b>
3.3.8	<b>Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e fluxo de vapor de água (FVA) .....</b>	<b>54</b>
3.4	AVALIAÇÃO DE FATORES ANTIMICROBIANOS DOS FILMES .....	55
3.4.1	<b>Atividade de água (<math>A_w</math>).....</b>	<b>55</b>
3.4.2	<b>Inibição do crescimento microbiano .....</b>	<b>55</b>
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
4.1	CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES FILMOGÊNICAS	58
4.1.1	Formação do complexo de polieletrólitos	58
4.1.2	Incorporação dos agentes antimicrobianos na suspensão polimérica	60
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	61
4.2.1	Aspecto visual e morfologia	62
4.2.2	Espessura	64
4.2.3	Grau de inchamento	67
4.2.4	Propriedades ópticas e proteção UV	69
4.2.5	Estrutura química	72
4.2.6	Análise termogravimétrica (TGA)	75
4.2.7	Propriedades mecânicas	79
4.2.8	Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e fluxo de vapor de água (FVA)	83
4.3	AVALIAÇÃO DE FATORES ANTIMICROBIANOS DOS FILMES	86
4.3.1	Atividade de água ( $A_w$ )	87
4.3.2	Inibição do crescimento microbiano	88
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>91</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	APÊNDICE A	113
	APÊNDICE B	114

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática do processo de produção e caracterização de curativos produzidos a partir de biopolímeros naturais.....	20
Figura 2 - Estruturas químicas da quitina e da quitosana.....	22
Figura 3 - Representação esquemática das possíveis estruturas obtidas a partir de soluções de quitosana e de quitina.....	24
Figura 4 - Estrutura química dos monômeros formadores do alginato, ácido $\beta$ -D-manurônico (blocos M) e ácido $\alpha$ -L-gulurônico (blocos G). ....	27
Figura 5 - Estrutura química do alginato.....	28
Figura 6 - Representação esquemática da reticulação do alginato por íons cálcio ..	30
Figura 7 - Representação esquemática do processo de cicatrização de uma ferida aberta (a) e de uma ferida coberta com curativo antimicrobiano (b).....	36
Figura 8 - Estruturas químicas do timol e do carvacrol, principais compostos responsáveis pela ação antimicrobiana do OEO.....	41
Figura 9 - Fluxograma das etapas envolvidas no trabalho: desenvolvimento e caracterização dos filmes ativos.....	45
Figura 10 – Sistema utilizado para mistura e homogeneização das soluções poliméricas de quitosana e alginato.....	49
Figura 11 - Soluções poliméricas de quitosana e de alginato.....	58
Figura 12 - Complexo de polieletrólitos resultante da mistura das soluções de quitosana e alginato, a uma velocidade de agitação de 1000 rpm (a) e 15500 rpm (b). .....	59
Figura 13 - Fotografias dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano (OR-10 e OR-20); gramatura 0,53 g cm <sup>-2</sup> . ....	63

Figura 14 - Morfologia dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano (OR-10 e OR-20); microscopia óptica, modo transmitância com magnificação de 5x.....	64
Figura 15 – Curvas de transmitância (%) por comprimento de onda dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm <sup>-2</sup> . .....	71
Figura 16 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos biopolímeros em pó, alginato (ALG) e quitosana (QUI), e dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA).....	72
Figura 17 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do óleo essencial de orégano (OEO), filmes compostos de quitosana e alginato (CA) e filmes compostos de quitosana, alginato e óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5).....	74
Figura 18 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do orégano (OR), filmes compostos de quitosana e alginato (CA) e filmes compostos de quitosana, alginato e orégano (OR-10 e OR-20). .....	75
Figura 19 - Curvas de TG e DTG para os biopolímeros alginato (ALG) e quitosana (QUI) e para o orégano cominuído (OR); taxa de aquecimento = 10 °C min <sup>-1</sup> e vazão de N <sub>2</sub> = 100 mL min <sup>-1</sup> .....	76
Figura 20 - Curvas de TG e DTG para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20); taxa de aquecimento = 10 °C min <sup>-1</sup> e vazão de N <sub>2</sub> = 100 mL min <sup>-1</sup> . .....	78
Figura 21 - Imagem da inibição do crescimento de <i>Escherichia coli</i> (EC) e <i>Staphylococcus aureus</i> (SA), após 24 h de incubação, para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo orégano (OR-10 e OR-20) e contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5).....	88

Figura B1 - Morfologia dos filmes OEO-1; microscopia óptica, modo transmitância com magnificação de 5x.....	114
Figura B2 - Espectro de FTIR dos filmes OEO-1.....	116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura para os filmes compostos de quitosana e alginato, contendo óleo de orégano e orégano na sua composição, em diferentes proporções. ....	57
Tabela 2 - Espessura dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano em pó (OR-10 e OR-20), para a gramatura de 0,53 g cm <sup>-2</sup> .....	65
Tabela 3 - Grau de inchamento em água e em solução salina, que simula o exsudato de feridas, para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano em pó (OR-10 e OR-20).....	67
Tabela 4 - Propriedades ópticas dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm <sup>-2</sup> .....	69
Tabela 5 – Propriedades mecânicas dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm <sup>-2</sup> .....	80
Tabela 6 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e fluxo de vapor de água (FVA) para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm <sup>-2</sup> . ....	84
Tabela 7 - Atividade de água (A <sub>w</sub> ) para filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano (OR-10 e OR-20).....	87
Tabela 8 - Halo de inibição do crescimento de <i>Escherichia coli</i> (EC) e <i>Staphylococcus aureus</i> (SA), após 24 h de incubação, para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo orégano (OR-10 e OR-20) e contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) .....	89

Tabela B1 - Espessura, grau de inchamento (GI) e propriedades de barreira ao vapor de água (PVA e FVA) dos filmes OEO-1..... 115

Tabela B2 - Propriedades mecânicas dos filmes OEO-1..... 115



## 1 INTRODUÇÃO

Os curativos tradicionais, como gaze e algodão, vêm sendo substituídos por outros que forneçam um ambiente mais adequado para a cicatrização de feridas, entre eles destacam-se os filmes poliméricos. Alguns polímeros biodegradáveis, como gelatina, alginato, colágeno, amido e quitosana, provenientes de fontes renováveis, estão ganhando destaque na área biomédica, principalmente para aplicação como curativos, pois em virtude de suas propriedades, podem atuar como substituintes parciais de alguns materiais sintéticos não biodegradáveis.

A quitosana é um polímero com ampla variedade de aplicações devido às suas propriedades funcionais, como atividade antibacteriana, não-toxicidade e biodegradabilidade, porém, possui elevada hidrofiliabilidade e os filmes produzidos a partir dessa macromolécula apresentam elevado grau de inchamento quando em contato com água, limitando sua aplicação em alguns casos. A fim de superar essas limitações, algumas alternativas podem ser testadas, dentre elas, a combinação de biopolímeros com diferentes características para que as propriedades desejadas sejam alcançadas no material final. O alginato é um polímero natural amplamente aplicado em curativos para feridas exsudativas e que, devido a seus grupos funcionais, pode ser facilmente misturado com outros biopolímeros formando uma estrutura reticulada que pode aumentar a estabilidade física do material do curativo e proporcionar um ambiente úmido adequado para cicatrização. A quitosana (polissacarídeo catiônico) e o alginato (polissacarídeo aniônico) quando combinados podem formar complexos de polieletrólitos (PECs) com grande potencial para aplicações biomédicas, sendo o seu caráter iônico fundamental na formação de diversas estruturas, tais quais nanopartículas, hidrogéis e filmes.

Dentre as características desejadas em um curativo, está a ação contra microrganismos patogênicos. Para melhorar as propriedades antimicrobianas dos curativos, diferentes compostos podem ser incorporados em sua estrutura, como antibióticos, nanopartículas de prata e produtos naturais, por exemplo, mel e óleos essenciais. A incorporação de óleos essenciais em matrizes poliméricas apresenta-se como uma possibilidade interessante para produção de filmes ativos para curativos, devido à presença de compostos bioativos que conferem aos filmes atividade antimicrobiana. Além de suas propriedades bactericidas e fungicidas, o uso desses óleos na área farmacêutica é cada vez mais difundido, pois representam uma

alternativa viável a compostos sintéticos, sendo substituintes naturais e ambientalmente amigáveis. O óleo essencial de orégano apresenta compostos antimicrobianos que inibem uma ampla variedade de microrganismos, logo, sua utilização se torna benéfica em relação a outros óleos que, muitas vezes, apresentam um espectro de ação antimicrobiana mais limitado.

O custo dos óleos essenciais, dependendo da sua natureza, pode ser bastante elevado, uma vez que estão incluídos os custos relacionados à extração do óleo. Além disso, a concentração de óleo necessária para exibir as características desejadas nos curativos, geralmente, é baixa. Desta forma, a sua substituição por compostos que contêm esses óleos sem a necessidade de extração apresenta-se como uma alternativa vantajosa. Outros aspectos que devem ser considerados são o rendimento do processo de extração e a qualidade do produto final, uma vez que o processo deve apresentar condições de operação brandas para manter as características dos óleos. Por exemplo, a quantidade de óleo extraída das folhas de orégano é pequena em relação à sua massa seca (2 a 6 %, v/m) e a utilização das suas folhas, embora não haja estudos relativos a este tema, reduziria os custos do processamento necessário para a obtenção do óleo essencial.

Visando a produção de curativos que proporcionem condições adequadas à cicatrização e com menor impacto ambiental associado, a utilização de biopolímeros como quitosana e alginato aliados a compostos naturais como o orégano e seu óleo essencial representam uma alternativa viável para o preparo de filmes ativos para curativos, visto que são materiais com potencial para esta aplicação específica.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Com o intuito de produzir curativos ambientalmente amigáveis e que forneçam um ambiente adequado à cicatrização, esse trabalho tem como objetivo geral a produção de filmes com propriedades antimicrobianas compostos de quitosana e alginato, incorporados com folhas de orégano ou com óleo essencial de orégano, para aplicação em curativos.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- produzir filmes compostos de quitosana e alginato com diferentes concentrações de folhas cominuídas de orégano ou de óleo essencial de orégano;
- caracterizar os diferentes filmes obtidos quanto às suas propriedades físico-químicas e mecânicas;
- avaliar o efeito da incorporação dos diferentes compostos, óleo e pó de orégano, nas propriedades dos filmes;
- avaliar as propriedades antimicrobianas dos filmes, comparando o efeito da incorporação do óleo essencial de orégano e das folhas secas cominuídas de orégano.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem por objetivo apresentar uma revisão bibliográfica das pesquisas que motivaram o desenvolvimento do presente trabalho, sendo essas informações importantes para uma melhor compreensão dos objetos envolvidos neste estudo. Primeiramente, estão descritos alguns conceitos e as características importantes dos curativos. Após, são apresentados e discutidos os conceitos básicos, as características e a utilização de biopolímeros para a produção de curativos, mais especificamente sobre os polímeros utilizados neste trabalho: a quitosana e o alginato. Também, são abordados conceitos sobre filmes ativos e a sua utilização como curativos antimicrobianos, bem como as propriedades de óleos essenciais e sua utilização como agentes bioativos, destacando o óleo essencial de orégano. Ainda, há uma breve descrição relativa ao orégano, utilizado também neste trabalho como agente antimicrobiano.

### 2.1 CURATIVOS

A pele é o maior órgão do corpo humano e é responsável por sua proteção contra patógenos e desidratação causadas por agressões ambientais, atuando como uma barreira físico-química. No entanto, é o órgão mais frequentemente ferido no corpo humano. Quando a pele está lesionada, a ação de patógenos na ferida formada é uma questão muito desafiadora para a recuperação da pele lesada (HOQUE; HALDAR, 2017; VARAPRASAD et al., 2020).

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que requer um ambiente adequado para sua promoção sendo necessária, muitas vezes, a utilização de curativos para uma cura efetiva. Durante a cicatrização, o curativo protege a lesão e contribui para a recuperação dos tecidos dérmicos e epidérmicos (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014). Para a confecção de um curativo adequado, se faz necessário considerar as características da ferida, tempo estimado de cicatrização, bem como as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material utilizado (ÁLVAREZ-PAINO; MUÑOZ-BONILLA; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2017).

Os curativos tradicionais (naturais ou sintéticos), como gaze e algodão, são usados para manter as feridas secas, pois permitem a evaporação dos exsudatos e para reduzir a entrada de bactérias. Quando há uma drenagem excessiva da ferida, esse tipo de curativo tende a aderir ao ferimento, tornando dolorosa a sua remoção, muitas vezes, aumentando ou voltando ao estágio inicial da lesão. Além disso, como os curativos tradicionais não proporcionam um ambiente úmido para a ferida, eles vêm sendo substituídos por curativos com formulações que atendam essa exigência e com melhores propriedades (BOATENG et al., 2008; TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2013).

A seleção do curativo deve estar baseada em sua capacidade de fornecer ou manter o ambiente úmido, absorver o excesso de fluidos e as secreções das feridas (MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017), melhorar a migração epidérmica, propiciar a regeneração do tecido conjuntivo, permitir trocas gasosas, manter a temperatura adequada do tecido para melhorar a fluxo sanguíneo, fornecer proteção contra microrganismos patogênicos e, além disso, deve ser de fácil remoção (não aderir à ferida), ser estéril, não-tóxico e não-alergênico (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). O curativo também deve apresentar resistência mecânica, propriedades hemostáticas e permeabilidade ao vapor de água adequadas à aplicação. Todas essas propriedades, se adequadamente aplicadas, podem melhorar o processo de cicatrização de ferimentos, sendo a combinação de materiais uma alternativa viável para se obter as características desejadas (MA; YU; MA, 2007; VARAPRASAD et al., 2020).

Os curativos podem ser não oclusivos (permitindo elevadas taxas de transmissão de vapor de água), como compressas de gaze, semi-oclusivos ou oclusivos (apresentando menores taxas de transmissão de vapor de água), disponíveis nas formas de filmes, espumas, hidrogéis e hidrocoloides (DEGREEF, 1998; STRECKER-MCGRAW; JONES; BAER, 2007; TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2013).

Novos curativos estão sendo desenvolvidos para manter um ambiente adequado à ferida e não apenas para cobri-la, mas também ajudar na sua cicatrização. Com base na causa e no tipo de ferida, inúmeros produtos estão disponíveis no mercado (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015), como o Fibracol Plus® e o Promogran® (baseados em colágeno), a Membracel (membrana regeneradora), curativos hidrocoloides e hidrogéis.

Diversos materiais, naturais ou sintéticos, são utilizados na produção de curativos devido à variedade de formas nas quais estes produtos se apresentam. Adicionalmente, com o objetivo de melhorar e/ou obter as propriedades desejadas, estruturas compostas por biopolímeros naturais vêm sendo estudadas com uso potencial como curativos, tendo em vista suas atrativas propriedades para aplicação na área biomédica (BAI et al., 2017).

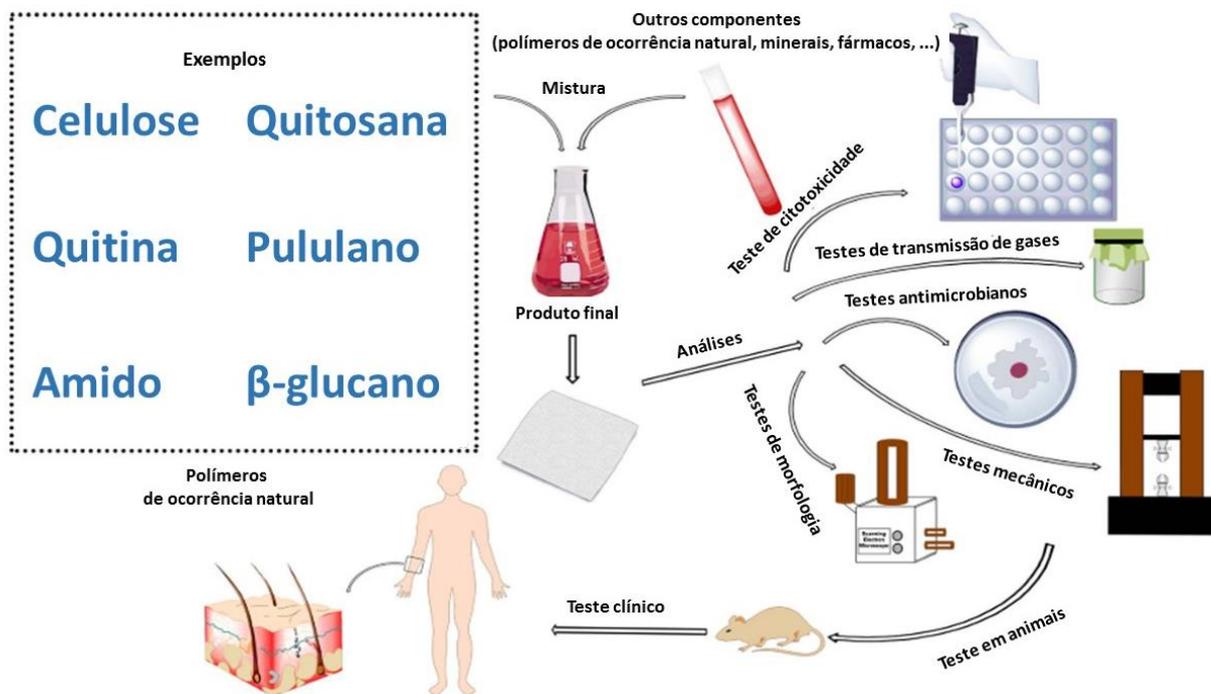
## 2.2 BIOPOLÍMEROS PARA PRODUÇÃO DE CURATIVOS

Biopolímeros naturais, como polissacarídeos (alginatos, quitina, quitosana, heparina, condroitina), proteoglicanos e proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, queratina, fibroína de seda, membrana de casca de ovo), podem atuar como substituintes parciais de alguns materiais sintéticos não biodegradáveis utilizados como curativos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e similaridade a macromoléculas reconhecidas pelo corpo humano. Além disso, a utilização desses biopolímeros pode reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte dos curativos que, devido à sua natureza, apresentam baixa possibilidade de reciclagem (BAI et al., 2017; MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014).

Em função das características citadas, a maioria dos polímeros de ocorrência natural apresenta boa aceitação por sistemas biológicos, fato que reduz a reação imunológica que é frequentemente detectada com o uso de polímeros sintéticos (MANO et al., 2007). Porém, de acordo com Mogosanu e Grumezescu (2014), as macromoléculas naturais apresentam resistência mecânica relativamente baixa em comparação com polímeros sintéticos utilizados em curativos. A partir de sua reticulação ou mistura com polímeros sintéticos, as propriedades mecânicas dos polímeros naturais são melhoradas, no entanto, sua biodegradabilidade e sua biocompatibilidade podem ser afetadas por esses procedimentos.

A produção dos materiais para cobrir ferimentos é feita a partir do preparo de uma solução polimérica que dará origem à estrutura (filme, hidrogel, espuma, dentre outros) com uso potencial como curativo. Essa estrutura passa por diversas análises, tais como transmissão de gases, citotoxicidade, testes mecânicos, estudo de morfologia, atividade antimicrobiana e, por fim, testes *in vivo* para avaliar a evolução da cicatrização (NASERI-NOSAR; ZIORA, 2018). Uma representação esquemática do processo de desenvolvimento de um curativo é apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Ilustração esquemática do processo de produção e caracterização de curativos produzidos a partir de biopolímeros naturais.



Fonte: adaptado de Naseri-Nosar, Ziora (2018).

Polissacarídeos (como quitosana e alginato) e proteínas (como colágeno, elastina e fibrinogênio) são os polímeros naturais mais comumente utilizados na área de recuperação de tecidos (MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007; MOGOSANU; GRUMEZESCU, 2014; WIEGAND; HIPLER, 2010).

De acordo com Malafaya, Silva e Reis (2007), os polissacarídeos oferecem algumas vantagens em relação aos outros biopolímeros, como hemocompatibilidade e menores custos. São divididos em neutros (dextranos, celulose), ácidos (ácido algínico, ácido hialurônico), básicos (quitina, quitosana) ou polissacarídeos sulfatados tais quais heparina e condroitina (KENNEDY; KNILL; THORLEY, 2011).

Polissacarídeos que apresentam apenas um tipo de monossacarídeo são conhecidos como homopolissacarídeos ou homoglicanos, enquanto aqueles que apresentam mais de um monossacarídeo são conhecidos como heteropolissacarídeos ou heteroglicanos (D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008).

Os homoglicanos são materiais biocompatíveis utilizados como moduladores locais da resposta celular, participando de forma ativa do processo de cicatrização,

sendo a celulose, a quitosana, a quitina, o dextrano e o amido materiais bastante utilizados (LLOYD et al., 1998; NASERI-NOSAR; ZIORA, 2018).

Alguns heteroglicanos, tais quais alginatos, agarose, carrageninas, pectinas, gomas e glicosaminoglicanos, possuem aplicações importantes na área biomédica, especialmente devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e características físico-químicas. Além disso, são formadores de filme ou de gel, apresentando propriedades espessantes (RINAUDO, 2008).

Na literatura são encontrados diversos estudos relacionados às aplicações de quitosana e alginato como polímeros para produção de curativos (CHEN et al., 2017; DANTAS et al., 2011; MENG et al., 2010; XIE et al., 2018), fato que demonstra seu potencial de aplicação na área. A seguir serão apresentadas de forma detalhada as características desses materiais, que são objeto deste estudo.

### **2.2.1 Quitosana**

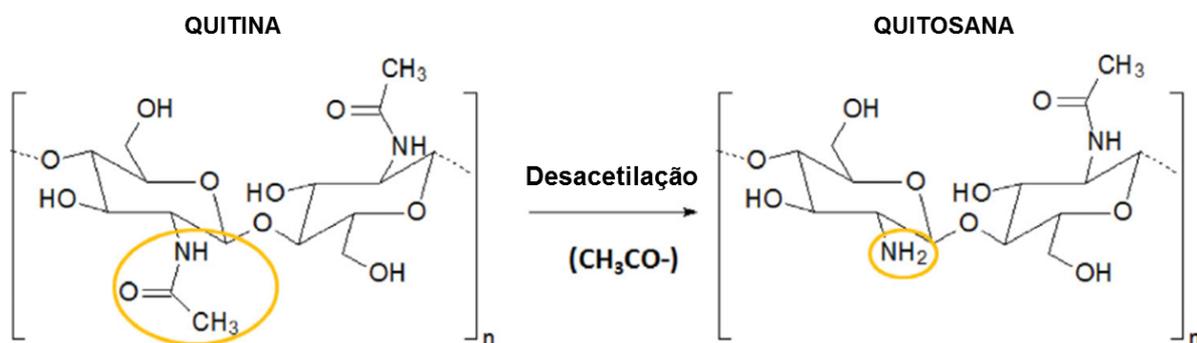
A quitosana, derivado mais importante da quitina, é um polímero bioativo com uma ampla variedade de aplicações devido às suas propriedades funcionais, como atividade antibacteriana, não-toxicidade e biodegradabilidade (MUXIKA et al., 2017; RINAUDO, 2008).

A quitina, um amino-polissacarídeo natural (poli-N-acetil-glicosamina), é o principal componente dos exoesqueletos de invertebrados, crustáceos, insetos e da parede celular dos fungos (JAYAKUMAR; REIS; MANO, 2006; SHI et al., 2006). De acordo com a sua origem, a quitina pode ser encontrada em três diferentes formas, definidas com relação à disposição das cadeias que constituem o polímero:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (RINAUDO, 2006).

A conversão de quitina em quitosana acontece através de processos de desacetilação enzimáticos ou químicos, no entanto, a conversão química é preferível devido ao menor custo e a adequação para a produção em grande escala (YOUNES; RINAUDO, 2015). Na Figura 2 estão representadas as estruturas químicas da quitina e da quitosana obtida após o processo de desacetilação. Ambas as estruturas são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN), porém, diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade. A quitina é insolúvel na maioria dos solventes e em sua estrutura predominam as unidades GlcNAc, enquanto na estrutura

química da quitosana a unidade GlcN se apresenta em maior proporção (BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008).

Figura 2 - Estruturas químicas da quitina e da quitosana.



Fonte: adaptado de Muxika et al. (2017).

A desacetilação química envolve o tratamento de quitina com hidróxidos em altas temperaturas, geralmente acima de 80 °C. Para aqueles tratamentos que usam altas concentrações de NaOH (50 – 60 %) e altas temperaturas (130 – 150 °C), a desacetilação ocorre rapidamente, aproximadamente em 2 horas. No entanto, sob condições mais severas, a massa molar da quitosana diminui, portanto, um equilíbrio entre as condições utilizadas no processo de desacetilação e as propriedades finais do polímero deve ser encontrado (LIZARDI-MENDOZA; MONAL; VALENCIA, 2016).

Durante a reação de desacetilação ocorre a conversão de grupos acetila (COCH<sub>3</sub>) em grupos amina (-NH<sub>2</sub>) que podem ser protonados, fazendo com que o polímero se torne solúvel em meio ácido, permitindo a sua utilização em diversas aplicações (BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008; CHANG et al., 1997). O grau de desacetilação da quitosana comercial típica está, geralmente, entre 70 e 95 % e sua massa molar varia entre 10 e 1000 kDa (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

A quitosana oferece várias vantagens em aplicações biomédicas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, resultando em produtos de degradação não tóxicos e que não produzem reações inflamatórias. Além do exposto, devido à sua natureza policatiónica, não tóxica, antimicrobiana e reabsorvível, a quitosana possui um amplo espectro de aplicações na área médica, como administração controlada de medicamentos, curativos, engenharia de tecidos, anticoagulante sanguíneo, biomaterial de regeneração óssea e agente antimicrobiano (ANITHA et al., 2014;

BUGNICOURT; LADAVIÈRE, 2016; VUNAIN; MISHRA; MAMBA, 2016). Além disso, esse polímero é biologicamente renovável, biodegradável e biofuncional (KHOR; LIM, 2003).

A quitosana é, também, um material bioadesivo. As propriedades adesivas da quitosana em estado inchado demonstraram persistir durante contatos repetidos do polímero com o substrato (GEORGE; ABRAHAM, 2006), o que implica que, além da adesão por hidratação, muitos outros mecanismos, como ligações de hidrogênio e interações iônicas, poderiam estar envolvidos (MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007).

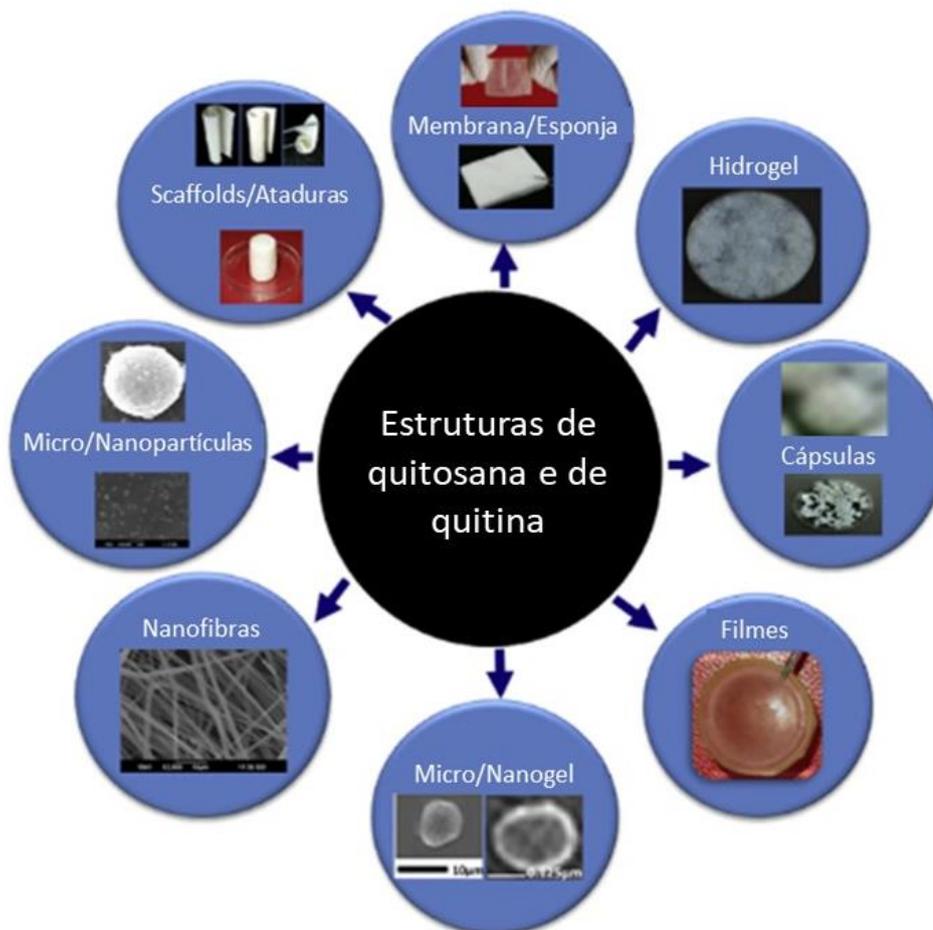
#### 2.2.1.1 Solubilidade e estruturas formadas da quitosana

A quitosana se dissolve facilmente em pH baixo, enquanto é insolúvel em faixas de pH superiores a 6,0 (MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007; RINAUDO, 2006). Os solventes mais utilizados para a solubilização da quitosana são os ácidos monocarboxílicos, que apresentam um hidrogênio ionizável em sua estrutura e atuam apenas como doadores de prótons na solução, como por exemplo o ácido acético e o ácido fórmico. Os ácidos carboxílicos naturais, tais quais os ácidos láctico, cítrico, málico e glicólico, vastamente utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica, também podem ser utilizados (CHEN et al., 2007).

Quando a quitosana é dissolvida em meio ácido, os grupos amino da cadeia protonam e o polímero se torna catiônico, permitindo que ele interaja com diversos tipos de moléculas (LIZARDI-MENDOZA; MONAL; VALENCIA, 2016). Acredita-se que esta carga positiva seja responsável por sua atividade antimicrobiana, através da interação com as membranas celulares carregadas negativamente de microrganismos (CAZÓN et al., 2017).

A solubilização da quitosana permite a produção de diversas estruturas, tais como filmes, nanofibras, hidrogéis, membranas, dentre outros, embora alguns usos em sua forma pulverulenta não dissolvida também tenham sido estudados recentemente (AHMED; IKRAM, 2016; ARDILA et al., 2017). Na Figura 3 está apresentado um esquema das possíveis estruturas obtidas a partir da quitosana e da quitina.

Figura 3 - Representação esquemática das possíveis estruturas obtidas a partir de soluções de quitosana e de quitina.



Fonte: adaptado de Anitha et al. (2014).

Dentre as estruturas possíveis de se obter a partir desse biopolímero, ganham destaque os filmes, que vêm sendo estudados para aplicações na indústria alimentícia como embalagens, e as aplicações biomédicas e farmacêuticas para curativos. Mais detalhes sobre essa estrutura estão descritos a seguir.

#### 2.2.1.2 Filmes de quitosana

A obtenção e utilização de filmes à base de quitosana, sejam porosos ou densos, exploram sua natureza policatiónica. A solubilização do polímero se dá em soluções aquosas ácidas, sendo a origem da quitosana e propriedades como o grau de desacetilação e massa molar parâmetros que influenciam em sua solubilidade. No processo de formação dos filmes, o tipo de ácido utilizado como solvente e a técnica

de obtenção são fatores que influenciam fortemente nas características do produto final (PAVONI, 2018).

A escolha do solvente adequado é de grande importância para conferir aos filmes de quitosana as propriedades desejadas. As propriedades dos filmes, tais quais permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas, são fortemente influenciadas pelo tipo de ácido utilizado na solubilização do polímero, pois interagem de maneira distinta, gerando filmes com diferentes características. De acordo com a literatura, o solvente mais utilizado no processo de obtenção de filmes de quitosana é o ácido acético, porém, o ácido láctico também vem sendo estudado nos últimos anos (CHEN et al., 2009; VELÁSQUEZ-COCK et al., 2014).

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) é um ácido orgânico natural amplamente utilizado na indústria alimentícia, cosmética, têxtil e farmacêutica, apresentando reatividade bifuncional devida à presença de um grupo hidroxila e um grupo carboxila (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013). Em filmes de quitosana, esse ácido tem sido estudado devido à sua característica plastificante, conferindo maior alongação e menor rigidez, podendo também auxiliar nas propriedades antimicrobianas dos filmes obtidos (PEH; KHAN; CH'NG, 2000; VELÁSQUEZ-COCK et al., 2014).

Pavoni, Luchese e Tessaro (2019) estudaram a influência do tipo de ácido, láctico ou acético, para a solubilização da quitosana nas propriedades de filmes à base de quitosana e quitosana/amido. Os filmes preparados com ácido acético apresentaram maior rigidez e menor deformação, resultando em maiores valores do módulo de Young e menor porcentagem de alongação até a ruptura, em comparação aos filmes preparados com ácido láctico. Além disso, os filmes contendo ácido acético apresentaram menores valores de permeação ao vapor de água.

Em geral, independentemente do ácido utilizado como solvente, filmes de quitosana apresentam elevada hidrofiliabilidade, fazendo com que esses materiais apresentem baixa estabilidade em água e elevado grau de inchamento, fato que pode limitar sua aplicação em alguns casos (PAVONI, 2018; SCHAEFER et al., 2020). Dessa forma, se faz necessário promover a reticulação dos filmes ou combinação com outros materiais de fonte renovável ou sintética para que se alcance as propriedades desejadas.

O glutaraldeído é o reticulante mais utilizado na produção de filmes de quitosana devido à sua estabilidade, apesar de sua citotoxicidade (LI et al., 2013).

Baldino et al. (2015) relataram a toxicidade e a migração do glutaraldeído presente na matriz polimérica, fato que pode limitar sua aplicação, principalmente como curativo. Com isso, a mistura de materiais, principalmente os de fonte renovável como amido, gelatina, alginato, colágeno, dentre outros, se torna uma alternativa potencial para obtenção das propriedades desejadas no filme final.

### 2.2.1.3 Aplicação da quitosana em curativos

Na literatura constam diversos estudos envolvendo a aplicação de estruturas de quitosana como potenciais curativos, devido às suas propriedades, principalmente sua atividade antimicrobiana e biocompatibilidade. Exemplos desses estudos são a avaliação de membranas de quitosana com grau de desacetilação de 75 % como curativo para cicatrização de feridas (AZAD et al., 2004) e de ataduras microporosas compostas de hidrogel/nanofibrina de quitosana para regeneração de tecido da pele (KUMAR et al., 2012), demonstrando a variedade de estruturas que podem ser obtidas a partir desse biopolímero.

A quitosana também pode ser utilizada como matriz para liberação controlada de fármacos e os curativos feitos desse biopolímero estão ganhando atenção na área da medicina (AHSAN et al., 2018). Ma et al. (2017) avaliaram a utilização de filmes de quitosana como curativo para a liberação controlada de fármacos. Os estudos *in vitro* comprovaram a liberação controlada dos medicamentos, atribuída pelos autores ao impedimento da estrutura compacta formada. Os autores afirmam que essa propriedade é bastante interessante para curativos e que esses filmes poderiam apresentar uma alta eficiência terapêutica para melhorar a cicatrização de feridas.

Existem no mercado curativos comerciais à base de quitosana como o KyoCel®. Esse curativo é composto por fibras de quitosana e pode ser utilizado para feridas de moderada a alta exsudação.

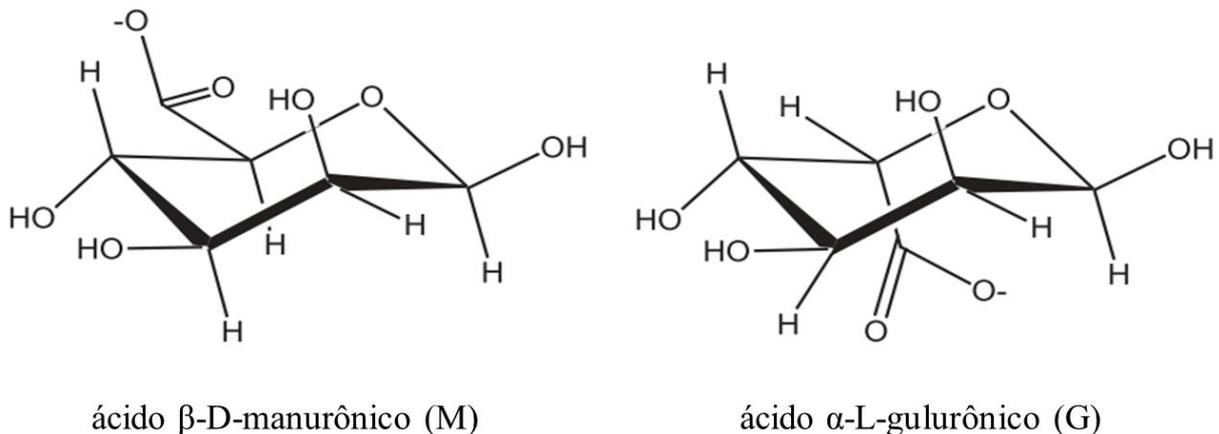
## 2.2.2 Alginato

Os alginatos são polissacarídeos aniônicos lineares não ramificados encontrados em algas marinhas e algumas bactérias (GEORGE; ABRAHAM, 2006; SZEKALSKA et al., 2016). A maioria dos alginatos é obtida comercialmente a partir

de algas marinhas marrons, o hiperbóreo de *Laminaria*, *Ascophyllum nodosum* e *Macro-cystis pyrifera*, nos quais o alginato pode compreender até 40 % da sua massa seca. Esse material pode dar origem a fibras naturais altamente absorventes, como o alginato de cálcio e o alginato de sódio (LI et al., 2011; QIN; HU; LUO, 2006; THU; ZULFAKAR; NG, 2012; WIEGAND; HIPLER, 2010).

Os alginatos são copolímeros em bloco de polissacarídeos naturalmente compostos por regiões de monômeros de ácido  $\beta$ -D-manurônico (blocos M), regiões de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (blocos G) e regiões de unidades M e G intercaladas (STEVENS et al., 2004). Na Figura 4 estão representadas as estruturas químicas de ambos os monômeros (blocos) formadores do alginato.

Figura 4 - Estrutura química dos monômeros formadores do alginato, ácido  $\beta$ -D-manurônico (blocos M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (blocos G).



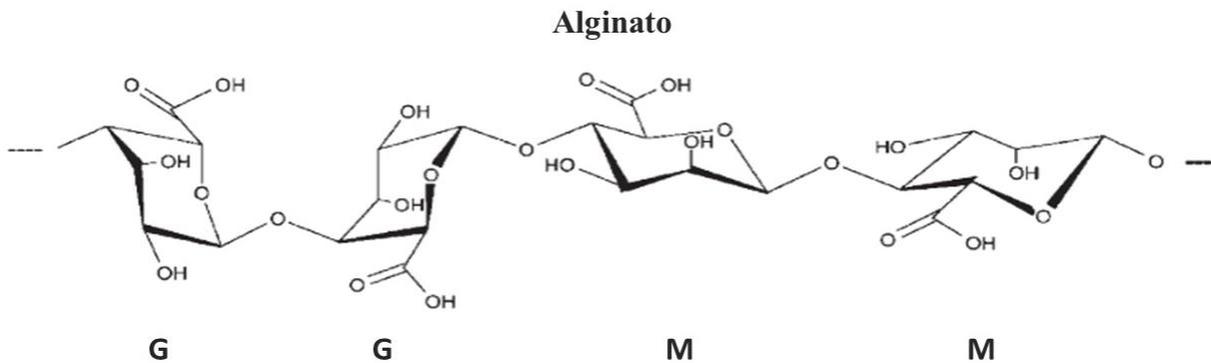
Fonte: adaptado de Stevens et al. (2004).

A composição química e a sequência de unidades M e G, que representa a estrutura primária do alginato, dependem da fonte biológica, das condições de crescimento e dos efeitos ambientais (GOMEZ et al., 2009; MURILLO-ÁLVAREZ; HERNÁNDEZ-CARMONA, 2007). Na Figura 5 está representada a estrutura química do alginato.

Para a obtenção desse biopolímero, as algas marinhas marrons são lavadas, maceradas e após, o alginato é extraído usando carbonato de sódio. O extrato é filtrado e adiciona-se cloreto de sódio ou de cálcio ao filtrado, formando um precipitado fibroso de alginato de sódio ou de cálcio. Este sal de alginato pode ser transformado em ácido algínico por tratamento com HCl diluído. Após uma série de purificações, o

alginato é seco e pulverizado em diferentes formas iônicas (RINAUDO, 2008; SZEKALSKA et al., 2016).

Figura 5 - Estrutura química do alginato.



Fonte: adaptado de Wiegand e Hipler (2010).

O alginato possui um elevado grau de heterogeneidade físico-química, o que influencia na sua qualidade e determina sua aplicabilidade. Está disponível comercialmente em diferentes massas molares, composição e padrão de distribuição dos blocos M e G, fatores responsáveis por suas propriedades físico-químicas, como viscosidade, transição sol / gel e capacidade de absorção de água. A massa molar do alginato comercial, expressa como uma média das massas de todas as moléculas presentes na amostra, varia entre 33 000 e 400 000 g mol<sup>-1</sup> (SZEKALSKA et al., 2016).

As indústrias médica e farmacêutica vêm demonstrando um interesse crescente em biopolímeros em geral e em alginatos em particular, pois oferecem uma alternativa viável para sistemas de liberação controlada. O alginato oferece vantagens sobre polímeros sintéticos, pois forma hidrogéis em pHs e temperaturas relativamente moderados e é, geralmente, considerado como não tóxico, biocompatível, biodegradável, mais barato e abundantemente disponível na natureza; além disso, o alginato atende ao importante requisito de ser passível de esterilização e armazenamento. Todas essas vantagens tornam os alginatos materiais muito úteis para aplicações biomédicas, especialmente para administração controlada de medicamentos e outros compostos biologicamente ativos e para o encapsulamento de células (D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008).

Os alginatos formam filmes fortes e fibras no estado sólido devido à sua estrutura linear e alta massa molar. Em pH baixo, os alginatos formam géis ácidos

estabilizados por ligações de hidrogênio. Esse biopolímero apresenta capacidade de reter água, bem como propriedades de gelificação e estabilização, além do seu caráter espessante (aumento da viscosidade do solvente após a dissolução) e suas propriedades de troca iônica (RINAUDO, 2008).

#### 2.2.2.1 Solubilidade do alginato

O alginato de sódio é solúvel em água fria, formando uma solução viscosa e coloidal. É insolúvel em álcool e em soluções hidroalcólicas, nas quais o teor de álcool é superior a 30 % em massa. Também é insolúvel em outros solventes orgânicos como clorofórmio e éter, e em ácidos em que o pH da solução resultante seja menor que 3,0. O alginato de cálcio é, no entanto, praticamente insolúvel em água e solventes orgânicos, mas solúvel em citrato de sódio (SACHAN et al., 2009; SHILPA; AGRAWAL; RAY, 2003).

A solubilidade dos alginatos é limitada pelo pH do solvente (uma diminuição do pH abaixo de pKa 3,38–3,65 pode levar à precipitação de polímeros), força iônica e o conteúdo de “íons gelificantes” (SACHAN et al., 2009; SZEKALSKA et al., 2016).

#### 2.2.2.2 Reticulação e formação de gel

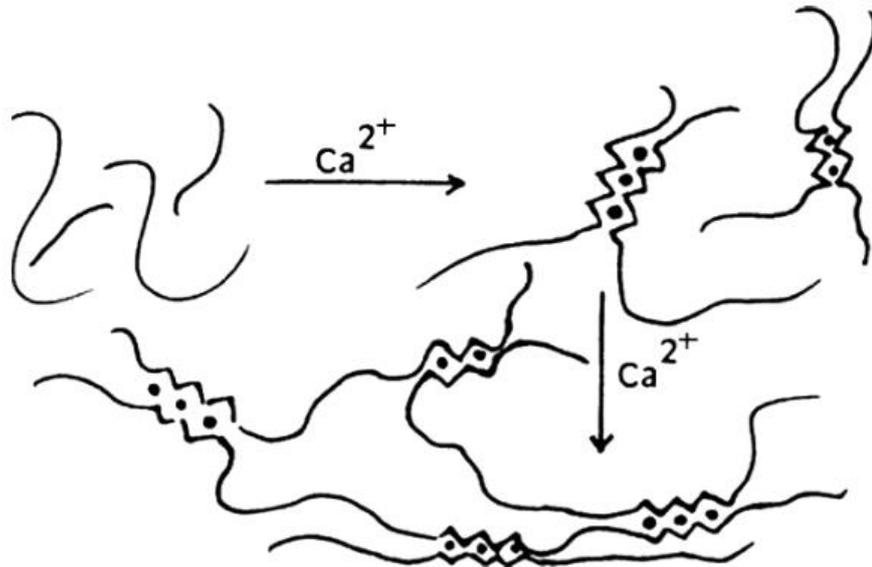
Os alginatos podem ser facilmente modificados por meio de reticulação química ou física para formar hidrogéis e melhorar as propriedades físico-químicas e/ou a atividade biológica. Muitos métodos foram descritos para a reticulação de alginatos, dentre eles a reticulação iônica, a reticulação covalente e a transição de fase ou gelificação térmica (SHILPA; AGRAWAL; RAY, 2003).

Uma das formas mais comuns de conduzir esse processo é a reticulação iônica (SUN; TAN, 2013). O alginato pode ser reticulado por interação iônica com contra-íons trivalentes (Fe(III) e Al) ou divalentes (Ca, Ba, Sr, entre outros), exceto por íons de magnésio (D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008; RINAUDO, 2008).

Na presença de cátions divalentes, pode ocorrer uma gelificação simples pela sua interação com os blocos de monômeros G para formar ligações iônicas. Em uma solução de alginato, blocos de monômeros M formam ligações fracas com cátions divalentes, no entanto, as interações entre blocos de monômeros G e cátions divalentes formam fortes ligações. Geralmente, o  $\text{Ca}^{2+}$  é o cátion divalente mais usado

para reticular ionicamente o alginato e o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) é o sal mais utilizado (SUN; TAN, 2013). Na Figura 6 pode-se observar uma representação esquemática do processo de reticulação do alginato por íons cálcio.

Figura 6 - Representação esquemática da reticulação do alginato por íons cálcio



Fonte: Rinaudo (2008).

Regiões de monômeros G em uma molécula de alginato podem ser ligadas a uma região semelhante em outra molécula por meio de íons cálcio ou outros cátions divalentes. Na presença de íons cálcio divalentes, o cálcio é ionicamente substituído no local carboxílico da molécula. Uma segunda molécula de alginato também pode se conectar ao íon cálcio, formando um elo no qual o cátion divalente liga as duas moléculas de alginato (BECKER; KIPKE; BRANDON, 2001; SHILPA; AGRAWAL; RAY, 2003). Esse processo resulta em uma cadeia de moléculas de alginato ligados ao cálcio que formam um gel sólido, ocorrendo a gelificação da solução (SACHAN et al., 2009). O cátion divalente de cálcio se encaixa em cavidades eletronegativas como ovos em uma caixa de ovos; dessa semelhança surge o termo modelo *Egg Box* (GRANT et al., 1973).

As características de gelificação dos alginatos são distintamente influenciadas pela composição e sequência do monômero (MURILLO-ÁLVAREZ; HERNÁNDEZ-CARMONA, 2007). A viscosidade da solução, massa molar e estrutura primária são fundamentais para determinar as propriedades de intumescimento e gelificação do alginato. A viscosidade da solução de alginato é quase constante para valores de pH

entre 6 e 8, mas, na concentração moderada, após uma lenta diminuição do pH, a viscosidade aumenta abaixo de pH igual a 4,5 e atinge um valor máximo em torno de valores de pH entre 3 e 3,5 e depois diminui (D'AYALA; MALINCONICO; LAURIENZO, 2008; RINAUDO, 2008).

### 2.2.2.3 Aplicação de alginato em curativos

Diversos estudos avaliam a utilização de alginatos, principalmente o de sódio, em estruturas para aplicações biomédicas, como em curativos (VARAPRASAD et al., 2020). Existem no mercado curativos comerciais de alginato de cálcio e sódio, tais quais o Kaltostat® (indicado para hemostasia) e o Melgisorb® Plus.

O alginato de cálcio pode absorver água ou fluidos corporais até 20 vezes a sua massa. Durante esse processo, o gel hidrofílico resultante fornece um ambiente úmido para a cicatrização da ferida. Como os curativos de alginato são muito porosos e não têm propriedades adesivas, um curativo secundário deve ser usado para protegê-los e fixá-los na ferida (GOH; HENG; CHAN, 2012; LEE et al., 2007).

Devido à propriedade de absorção elevada que apresentam, os curativos com alginatos são amplamente utilizados no tratamento de feridas exsudativas, criando um ambiente úmido adequado para uma cicatrização mais rápida, apresentando, também, propriedades hemostáticas. Além disso, os curativos de alginato podem ser removidos com menor dor e desconforto do que curativos convencionais (VARAPRASAD et al., 2020).

Os curativos de alginatos protegem os ferimentos da contaminação por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, imobilizando as bactérias dentro da sua matriz fibrosa. As fibras de alginato absorvem água e incham, os espaços entre as fibras são fechados e quaisquer bactérias que são transportadas no exsudado da ferida ficam presas no curativo (QIN, 2005). Enquanto o alginato exibe um forte efeito estático para bactérias, ele demonstra apenas uma ligeira inibição do crescimento de *Candida albicans*. As células de levedura são maiores que as células bacterianas e, portanto, podem não ficar presas com a mesma eficiência que as bactérias no gel formado (WIEGAND; HEINZE; HIPLER, 2009).

### 2.2.3 Filmes compostos de quitosana e alginato

A combinação de quitosana com alginato em aplicações para curativos vem sendo estudada por diversos autores em diferentes estruturas, incluindo filmes, hidrogéis e nanopartículas (BUENO et al., 2014; CHEN et al., 2017; MNDLOVU et al., 2019; RODRIGUES et al., 2008). Devido a seus grupos funcionais, o alginato pode ser facilmente misturado com outros biopolímeros e formar uma estrutura reticulada (VARAPRASAD et al., 2020). Essas estruturas de redes reticuladas podem aumentar a estabilidade física do material do curativo e proporcionar um ambiente úmido adequado para cicatrização (KARRI et al., 2016).

#### 2.2.3.1 Complexos de polieletrólitos (PECs)

Os complexos de polieletrólitos (PECs) são formados pela mistura de polímeros com cargas positivas ou negativas (policátions e poliânions), devido à interação eletrostática dos polieletrólitos, polímeros, de carga oposta na solução.

A formação de PECs é governada pelas características dos precursores (polímeros com cargas ligadas), como por exemplo, força e posição dos sítios iônicos, densidade de carga e rigidez das cadeias poliméricas, bem como o ambiente químico, (solvente, pH, temperatura e concentração) (TSUCHIDA; ABE, 1982; WEBSTER; HUGLIN; ROBB, 1997). Três diferentes tipos de PECs podem ser preparados em soluções aquosas (DOMARD; RINAUDO, 1980; WEBSTER; HUGLIN; ROBB, 1997):

- a) complexos de polieletrólitos solúveis (sistemas macroscopicamente homogêneos contendo pequenos agregados de PEC);
- b) sistemas coloidais turvos com partículas de PEC suspensas na faixa de transição para a separação de fases;
- c) sistemas bifásicos de líquido sobrenadante e PEC precipitado.

O tipo de sistema que se obtém depende das condições governantes citadas anteriormente (TSUCHIDA; ABE, 1982).

A quitosana (polissacarídeo catiônico) e o alginato (polissacarídeo aniônico) podem formar complexos de polieletrólitos, complexos interpoliméricos (IPCs), que vêm sendo utilizados principalmente para aplicações em áreas biológicas, sendo o caráter iônico desses polímeros fundamental na formação de diversas estruturas para

curativos, como nanopartículas, hidrogéis e filmes (MNDLOVU et al., 2019; RINAUDO, 2008). De acordo com Mndlovu et al. (2019), os filmes formados por PECs, assim como as nanopartículas e os hidrogéis, podem ser chamados de bioplataformas.

A complexação dessas macromoléculas por fortes interações eletrostáticas amino-carboxílicas, bem como por ligações de hidrogênio, resulta em melhor desempenho do produto final quando comparado a dispositivos compostos apenas pelos polímeros isolados (PIRES et al., 2018). A partir da comparação entre estudos a respeito de propriedades de filmes de quitosana puros e de filmes compostos de quitosana e alginato, é possível observar que a combinação dos polímeros melhorou a estabilidade do material em líquidos para condições de pH quase neutras e na presença de sais comumente encontrados em fluidos fisiológicos, quando comparado a filmes preparados apenas com quitosana (PAVONI; LUCHESE; TESSARO, 2019; PIRES et al., 2018; RODRIGUES et al., 2008; SCHAEFER et al., 2020).

#### 2.2.3.2 Condições de processamento para obtenção de filmes de PECs

As condições de mistura das soluções poliméricas afetam as propriedades finais do material obtido a partir de complexos de polieletrólitos. A influência das condições de preparo nas características de filmes de quitosana e alginato foi estudada por Rodrigues et al. (2008) a partir da variação da velocidade de agitação (100 a 500 rpm) e da taxa volumétrica de adição da solução de quitosana à solução de alginato (20 a 40 mL / h). A utilização de diferentes condições de processo afetou as propriedades físico-químicas dos filmes obtidos. A espessura do filme úmido aumenta com o aumento da vazão da solução de quitosana para uma mesma velocidade de agitação, mas reduz com o aumento da velocidade de agitação para a mesma vazão. A tensão de ruptura dos filmes aumentou tanto com o aumento da velocidade de agitação quanto com o aumento da taxa volumétrica da solução de adição de quitosana. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que, utilizando um protocolo simples de produção de filmes, envolvendo condições operacionais de processo controladas, foi possível obter com sucesso filmes fibrosos e homogêneos com características reprodutíveis adequadas à aplicação para tratamento e cobertura de feridas.

Caridade et al. (2013) utilizaram quitosana e alginato para o preparo de filmes de polieletrólitos por camadas (*layer-by-layer films*). Em filmes obtidos por essa

técnica, as soluções poliméricas não são misturadas, mas vertidas e secas em camadas, sendo cada uma delas feita por *casting* e seca antes da adição da próxima solução polimérica. Os autores relataram que os filmes obtidos eram biocompatíveis e permeáveis, altamente estáveis em solução fisiológica, demonstrando potencial para aplicação em cicatrização de feridas e a viabilidade da combinação desses biopolímeros.

Conforme pode-se observar na literatura, as condições de processo variam de autor para autor, normalmente sendo utilizada agitação mecânica para a mistura das soluções poliméricas ou o preparo de filmes por camadas, fatores que alteram as propriedades do material final, resultando em filmes com características bastante diferentes a partir da combinação dos mesmos polímeros.

#### **2.2.4 Técnicas de produção de filmes**

Os filmes podem, de maneira geral, ser obtidos a partir de dois processos: evaporação de solvente (*casting*) e extrusão. Dependendo do método de fabricação utilizado, diferentes estruturas podem ser obtidas: densas, porosas e compostas (PAVONI, 2018).

O processo de extrusão, quando comparado ao de *casting*, apresenta algumas vantagens, como menor tempo para produção e menor custo quando se opera em escala industrial. Porém, as altas temperaturas empregadas nesse método, normalmente superiores a 80 °C podem afetar as propriedades dos filmes (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2009). Deve-se observar que a quitosana não é um material termoplástico e se degrada antes de atingir sua temperatura de fusão, não podendo ser extrusada como, por exemplo, os polímeros derivados do petróleo (VAN DEN BROEK et al., 2015).

Em escala laboratorial, a técnica mais utilizada é o *casting*, método no qual o polímero é solubilizado no solvente e homogeneizado com plastificantes e demais aditivos necessários, formando uma mistura denominada solução filmogênica. Essa solução é espalhada em uma placa e submetida à secagem até a evaporação completa do solvente (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2009). Normalmente, a partir dessa metodologia são obtidos filmes e membranas com estrutura densa (PAVONI, 2018).

Ma, Yu e Ma (2007) prepararam membranas (densas e porosas, com a utilização de agente formador de poros) compostas de quitosana e alginato com duas

camadas, via *casting*. Segundo os autores, o processo de preparação foi simples e as membranas porosas apresentaram maior capacidade de absorção de água quando comparadas às membranas densas. As membranas compostas apresentaram propriedades mecânicas adequadas à aplicação como curativo, biocompatibilidade e permeação ao oxigênio.

## 2.3 FILMES ATIVOS PARA CURATIVOS

Materiais ativos são desenvolvidos de forma a incorporar componentes que liberam ou absorvem determinadas substâncias do produto ou da atmosfera que estão em contato, visando manter e/ou melhorar as condições do meio que cobrem/circundam (EUROPEAN COMMISSION, 2009).

Filmes com propriedades antimicrobianas caracterizam filmes ativos que são amplamente utilizados na indústria alimentícia como embalagens, bem como na indústria farmacêutica como curativos (HUBNER, 2017).

### 2.3.1 Curativos antimicrobianos

A estrutura e as funções desempenhadas pela pele, como sensações, regulação da temperatura, vigilância imunológica, prevenção da perda de água e a proteção de músculos subjacentes, ossos, ligamentos e órgãos internos de agentes biológicos, químicos, mecânicos e físicos externos, podem ser afetadas por lesões como cortes e queimaduras (CHUA et al., 2016; SUNDARAMURTHI; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2014).

Após o comprometimento da estrutura da pele, sua estrutura e funções devem ser restabelecidas o mais rápido possível para garantir a homeostase do organismo. Para isso, o processo de cicatrização da ferida inicia-se quase imediatamente após a ocorrência de uma lesão cutânea, a fim de evitar o risco de contaminação bacteriana (SIEDENBIEDEL; TILLER, 2012; SIMÕES et al., 2018).

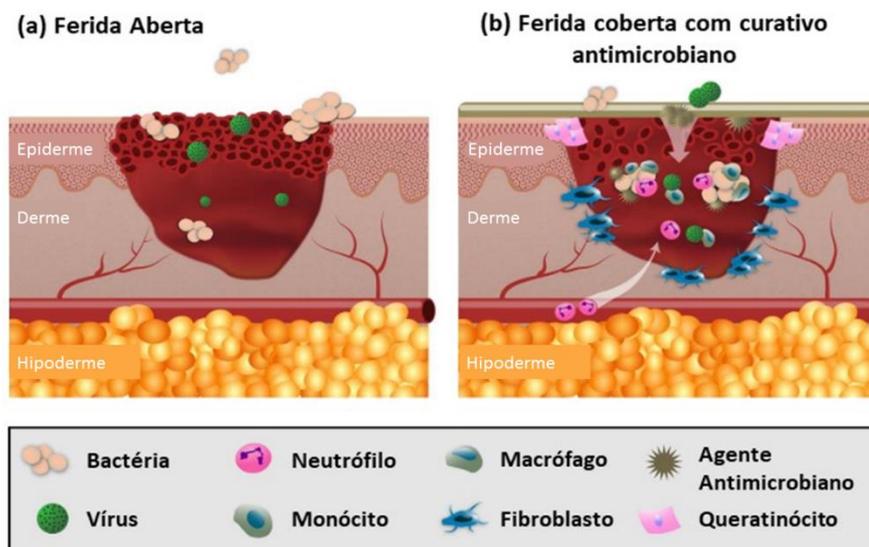
Segundo Han e Ceilley (2017), a cicatrização de feridas é um processo complexo e altamente regulado que é crítico para manter a função de barreira da pele. A infecção de uma ferida é evitada pelo sistema imunológico a partir da eliminação dos patógenos. Se o sistema imunológico não é capaz de remover o patógeno, a

infecção ocorre e compromete o processo normal de cicatrização, podendo resultar em uma ferida crônica (HAN; CEILLEY, 2017; SIDDIQUI; BERNSTEIN, 2010).

Uma ferida aberta é um local favorável para a colonização microbiana e, geralmente, as lesões são contaminadas por patógenos encontrados no ambiente circundante, isto é, microrganismos que estão nas mucosas e naturalmente presentes na pele (SARHEED et al., 2016; TEMPLER; BRITO, 2009). Nos estágios iniciais da formação de uma ferida crônica, as bactérias Gram-positivas, especificamente a *Staphylococcus aureus*, são predominantes. Nos estágios posteriores, as espécies Gram-negativas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* são observadas e tendem a invadir camadas mais profundas da pele, causando danos significativos aos tecidos (CARDONA; WILSON, 2015). Uma ferida aberta é vulnerável à contaminação bacteriana, levando a uma fase inflamatória prolongada.

Curativos contendo agentes antimicrobianos surgiram como opções viáveis para reduzir a colonização bacteriana da ferida e a infecção, a fim de melhorar o processo de cicatrização. O curativo antimicrobiano atua como uma barreira que impede a entrada e a proliferação de patógenos, podendo matar microrganismos invasores através da ação das substâncias contidas no curativo, além de suportar o processo de cicatrização (SIMÕES et al., 2018). Na Figura 7 estão representadas uma ferida aberta e uma coberta com curativo antimicrobiano, apresentando as diferenças no processo inflamatório e de cicatrização devido à ação do curativo ativo.

Figura 7 - Representação esquemática do processo de cicatrização de uma ferida aberta (a) e de uma ferida coberta com curativo antimicrobiano (b).



Fonte: adaptado de Simões et al. (2018).

Para melhorar as propriedades antimicrobianas dos curativos, diferentes compostos podem ser incorporados em sua estrutura. Esses agentes antimicrobianos podem ser definidos como substâncias que eliminam os microrganismos ou inibem seu crescimento e compreendem essencialmente antibióticos (tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina e sulfadiazina), nanopartículas de prata e produtos naturais, por exemplo, mel, óleos essenciais e quitosana (ÁLVAREZ-PAINO; MUÑOZ-BONILLA; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2017; SARHEED et al., 2016).

O interesse por filmes ativos para aplicação como curativo antimicrobiano vem crescendo nos últimos anos, sendo possível encontrar na literatura diversos estudos voltados para esta área, principalmente com utilização de biopolímeros e compostos naturais como agentes antimicrobianos (BAI et al., 2017; DIAS et al., 2011; SCHAEFER et al., 2020; TUMMALAPALLI et al., 2016). Dentre as substâncias naturais utilizadas, os óleos essenciais vêm sendo bastante utilizados na obtenção de filmes ativos para utilização como curativos bioativos (SIMÕES et al., 2018).

### **2.3.2 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos, límpidos e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com massa específica geralmente menor do que a da água. Essas substâncias são misturas naturais complexas que apresentam muitos componentes, dentre eles uma variedade de moléculas voláteis (BAKKALI et al., 2008). Esses óleos apresentam diversas propriedades atrativas, tais como propriedades antioxidantes, antivirais, anticarcinogênicas, inseticidas, anti-inflamatórias, antialérgicas e antimicrobianas (SEOW et al., 2013).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída principalmente aos compostos fenólicos, terpenos, álcoois alifáticos, aldeídos, cetonas, ácidos e iso-flavonóides que fazem parte de sua complexa composição (CHORIANOPOULOS et al., 2008; LAMBERT et al., 2001; TIWARI et al., 2009). A análise química de uma variedade de óleos essenciais demonstrou que, dentre os compostos citados, os principais constituintes de muitos desses óleos são o carvacrol, timol, citral, eugenol e os seus precursores (CHORIANOPOULOS et al., 2008; DEMETZOS; PERDETZOGLU; TAN, 2001; JULIANO; MATTANA; USAI, 2000).

Esses compostos são extraídos de várias plantas aromáticas, geralmente localizadas em países de clima temperado ou quente, como climas mediterrâneo e

tropical, onde representam uma parte importante da farmacopeia tradicional. Os óleos essenciais podem ser extraídos por meio de destilação com água ou vapor e, para o caso de frutas cítricas, por meio de prensagem a frio (BAKKALI et al., 2008; PÉREZ-RECALDE; RUIZ ARIAS; HERMIDA, 2018).

Até o ano de 2004, aproximadamente três mil diferentes óleos essenciais haviam sido identificados, dos quais 300 eram comercialmente importantes (BURT, 2004). Pode-se citar como exemplos dessas substâncias os óleos de tomilho, canela, alecrim, lavanda, eucalipto, capim-limão, orégano, dentre outros (JOUKI et al., 2014; LIAKOS et al., 2014).

Devido às suas propriedades bactericidas e fungicidas, o uso de óleos essenciais nas indústrias farmacêutica e alimentícia é cada vez mais difundido como alternativa aos produtos químicos sintéticos, representando substituintes ambientalmente amigáveis (BAKKALI et al., 2008). Além disso, em muitos casos, os óleos essenciais podem exercer efeitos benéficos mais acentuados do que compostos puros quimicamente sintetizados, devido à ação sinérgica da complexa mistura de componentes que podem interagir com diferentes sítios moleculares (SVOBODA; BROOKER; ZRUSTOVA, 2006).

Altiok, Altiok e Tihminlioglu (2010) prepararam e avaliaram filmes de quitosana incorporados com óleo de tomilho como curativos e Grande-Tovar et al. (2018) avaliaram filmes de quitosana com óleo essencial de *Thymus capitatus* para aplicação como embalagens. Em ambos os estudos, os autores concluíram que a utilização do óleo essencial melhorou as propriedades antimicrobianas dos filmes.

Muitos outros estudos de incorporação de OEs em matrizes poliméricas para obtenção de filmes ativos podem ser encontrados na literatura, todos eles demonstrando seu potencial para aplicação como agente antimicrobiano (ACOSTA et al., 2016; ATARÉS et al., 2010; GRANDE-TOVAR et al., 2018; HAGHIGHI et al., 2019; JOUKI et al., 2014). Contudo, é importante salientar que, geralmente, bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis a óleos essenciais que Gram-positivas (BURT, 2004).

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa hidrofílica rica em lipopolissacarídeo, que é quase impermeável aos compostos lipofílicos, impedindo a penetração do óleo essencial e, portanto, dos componentes antimicrobianos do óleo essencial (AL-REZA; RAHMAN; KANG, 2009). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas não possuem essa membrana externa, desta forma, os

componentes hidrofóbicos como óleos essenciais podem entrar em contato diretamente com a bicamada fosfolipídica da membrana celular e causar aumento da permeabilidade aos íons, bem como vazamentos de constituintes intracelulares (GAO et al., 2011).

No entanto, os óleos essenciais ainda podem atuar contra bactérias Gram-negativas, devido à presença das proteínas denominadas porinas na membrana externa que permitem a difusão de compostos com baixa massa molar (HOLLEY; PATEL, 2005; KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULAMATSIS, 2008). Alguns óleos essenciais, entre eles o óleo de orégano, são agentes eficazes tanto contra microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos (TIWARI et al., 2009). Dessa forma, esses óleos são mais indicados para aplicações em curativos, visto que as feridas podem ser contaminadas por ambos os grupos de bactérias.

Na última década, foram desenvolvidos diferentes estudos voltados para a utilização de óleo essencial de orégano como agente antimicrobiano em filmes ativos (AGUIRRE; BORNEO; LEON, 2013; MARTUCCI et al., 2015; PAGLIONE et al., 2019; PELISSARI et al., 2009). A seguir estão apresentadas algumas características, peculiaridades e aplicações do óleo essencial de orégano, bem como do orégano, a sua matéria-prima.

#### 2.3.2.1 Orégano (*Origanum vulgare* L.) e óleo essencial de orégano

O gênero *Origanum* é constituído por plantas herbáceas aromáticas que pertencem à família Lamiaceae. Essas plantas possuem folhas intensamente perfumadas e são nativas das regiões Mediterrânea, Euro-Siberiana, norte da África, bem como de outros países com climas que apresentam temperaturas moderadas. Dentre as plantas desse gênero está o orégano (*Origanum vulgare* L.), erva aromática perene de porte médio considerada a mais amplamente utilizada da família Lamiaceae (ALIGIANNIS et al., 2001; KHAN et al., 2018; LUKAS; SCHMIDERER; NOVAK, 2015).

*Origanum vulgare* L. é uma espécie variável. Na referência taxonômica mais recente e amplamente aceita para o gênero (IETSWAART, 1980), seis subespécies variáveis de *O. vulgare* foram identificadas com base em diferenças morfológicas. Além da morfologia, uma grande diversidade também pode ser encontrada na quantidade total e na composição qualitativa dos óleos essenciais produzidos (LUKAS; SCHMIDERER; NOVAK, 2015; MASTRO et al., 2017).

O orégano é uma erva que pertence a uma classe denominada plantas medicinais e aromáticas (MAPs, do *inglês medicinal and aromatic plants*). As MAPs contêm substâncias químicas biologicamente ativas, produzidas pelo metabolismo secundário da planta e que pertencem a várias classes químicas, como alcalóides, flavonóides, saponinas, esteróides e terpenóides, sendo esses compostos os responsáveis pelas propriedades medicinais dessas plantas. Os compostos ativos das MAPs são geralmente empregados diretamente em medicamentos, aromatização e conservação de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, tendo em vista suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (KHAN et al., 2018).

O orégano é a matéria-prima para a produção de óleo essencial de orégano, que representa aproximadamente de 2 a 6 % (v/m) da massa seca da planta (AZIZI; YAN; HONERMEIER, 2009; LICATA et al., 2015) e é utilizado largamente em estudos relacionados ao preparo de filmes ativos. Contudo, não foram encontrados estudos na literatura que utilizassem as folhas de orégano para produção de filmes com atividade antimicrobiana. Acredita-se que a incorporação de folhas secas e moídas na solução filmogênica pode ser vantajosa, pois reduziria o processamento necessário para a extração do óleo e, desta forma, os custos relativos à obtenção do óleo.

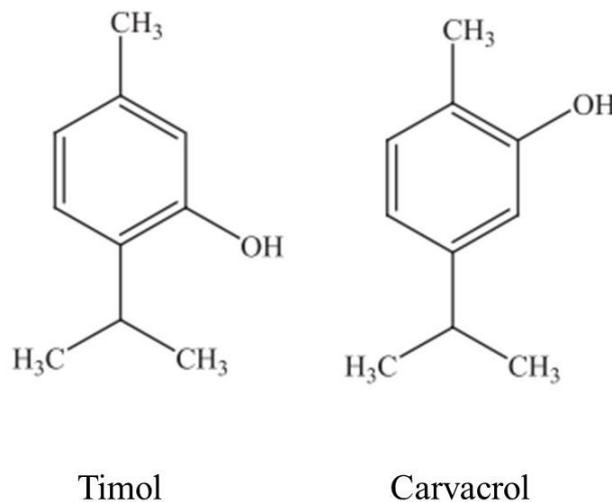
O óleo essencial de orégano (OEO) proveniente da espécie *Origanum vulgare* L. é composto por diferentes quantidades de hidrocarbonetos monoterpenos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno), sesquiterpenos ( $\beta$ -cariofileno), linalol, terpinen-4-ol e fenóis (FRAJ et al., 2019). Na maioria dos óleos provenientes dessa planta, os monoterpenóides constituem até 70 % do óleo total. Esses monoterpenóides compreendem principalmente compostos fenólicos (KHAN et al., 2018). Contudo, é importante mencionar que os constituintes e a concentração dos compostos do OEO geralmente variam devido a alguns fatores, como espécie da planta, condições do solo, época de colheita, localização geográfica, bem como condições climáticas e de crescimento (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017).

O OEO apresenta compostos antimicrobianos que atuam contra diversos microrganismos (BARBOSA et al., 2020). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano é atribuída ao timol e ao carvacrol, que são isômeros e os principais compostos fenólicos do óleo (BUSATTA et al., 2007; LI et al., 2018; MARCHESE et al., 2016; ZHOU et al., 2018).

Hernández-González et al. (2017) utilizaram o óleo essencial de orégano como agente antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em seu

estudo, os autores também atribuíram a capacidade antimicrobiana do OEO aos compostos timol e carvacrol, por meio da desintegração da membrana externa do microrganismo patogênico, causando a morte celular. Na Figura 8 estão representadas as estruturas químicas do timol e do seu isômero carvacrol.

Figura 8 - Estruturas químicas do timol e do carvacrol, principais compostos responsáveis pela ação antimicrobiana do OEO.



Fonte: adaptado de Simões et al. (2018).

A utilização do óleo em sua fase vapor foi estudada por Chang et al. (2017). Os autores avaliaram 18 óleos essenciais contra *D. Chrysanthemi* na fase vapor, dos quais apenas 7 apresentaram resultados de inibição, sendo o óleo de orégano o que apresentou maior zona de inibição do crescimento com diâmetro de  $44,7 \pm 1,6$  mm.

Além dos microrganismos citados, o óleo de orégano também demonstrou efeito inibitório contra *Shewanella putrefaciens* e *Yersinia enterocolitica* (JOUKI et al., 2014), *Alicyclobacillus spp.* (DUTRA et al., 2019), *Salmonella Enteritidis* (BARBOSA et al., 2020), *Candida albicans* (MANOHAR et al., 2001), entre outros.

A incorporação de OEO em matrizes poliméricas para produção de filmes ativos vem crescendo nos últimos anos, devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiana. Benavides, Villalobos-Carvajal e Reyes (2012) obtiveram filmes de alginato com diferentes graus de reticulação incorporados com óleo essencial de orégano. A incorporação do óleo na solução que deu origem aos filmes afetou significativamente as propriedades físicas do material. A espessura e o percentual de

elongação na ruptura aumentaram com a adição de OEO, enquanto a resistência à tração e a permeabilidade ao vapor de água diminuíram. Os filmes contendo OEO apresentaram atividade antimicrobiana e foram mais eficazes contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) do que contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*), sendo necessária uma concentração mínima de 1,0 % de OEO para garantir sua eficácia antibacteriana.

Outros autores também tiveram sua pesquisa baseada na utilização de óleo essencial de orégano em matrizes diversas, como por exemplo amido (LI et al., 2018), mucilagem de semente de marmelo (JOUKI et al., 2014) e polissuccinimida (HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2017). Em todos os estudos, os autores concluíram que a incorporação do óleo nas soluções filmogênicas aumentou a atividade antimicrobiana do filme obtido, demonstrando a viabilidade de sua utilização para essa finalidade.

Além de sua ampla ação contra microrganismos, o óleo essencial de orégano apresenta propriedades antioxidantes, de interesse para a indústria cosmética e de alimentos, bem como propriedades anti-inflamatórias, importantes para as indústrias farmacêutica e biomédica (HAN; PARKER, 2017; LEYVA-LÓPEZ et al., 2017), demonstrando os diversos benefícios do uso deste composto nessas áreas.

#### 2.3.2.2 Dispersão de óleos essenciais em matrizes poliméricas

Como foi descrito, os óleos essenciais têm sido largamente utilizados para a produção de filmes ativos. A preparação das dispersões formadoras de filmes requer a emulsificação da fase oleosa nas fases aquosas, formando uma mistura estável para a realização do *casting* (BONILLA et al., 2012). Na literatura, foram descritas algumas técnicas para produzir emulsões estáveis, a maioria delas utilizando emulsificantes.

Li et al. (2018) utilizaram Tween 80 como emulsificante para o preparo de filmes à base de amido de batata doce incorporados com óleo essencial de orégano. O emulsificante foi adicionado à solução polimérica em uma quantidade de 100 mg / L (em relação à quantidade de óleo) com agitação a 120 rpm durante 5 minutos. Os autores observaram que o tamanho médio das gotas de óleo aumentou significativamente durante o processo de secagem dos filmes.

De acordo com Bonilla et al. (2012), o tamanho da gota de óleo é um fator determinante para a estabilidade da emulsão e afeta outras propriedades importantes,

como a sua viscosidade. Os autores afirmam que os homogeneizadores rotor-estator são capazes de atingir tamanhos de partícula na faixa de 1  $\mu\text{m}$ . Isso pode ser reduzido ainda mais com a aplicação de homogeneizadores de alta pressão ao sistema. A microfluidização pode fornecer emulsões com partículas muito pequenas com distribuições de tamanho de partículas muito estreitas, uma vez que a emulsão é submetida a alta tensão de cisalhamento na câmara de interação. Dessa forma, Bonilla et al. (2012) estudaram a aplicação desses dois processos de homogeneização da emulsão sem utilizar emulsificantes. Foram preparadas dispersões com óleo de manjerição e de tomilho em solução polimérica de quitosana. Os autores empregaram duas condições de processo: (a) tratamento H1, homogeneização a 21500 rpm durante 4 minutos em um ultraturrax e (b) tratamento H2, que consistiu no tratamento H1 seguido de microfluidização a 165 MPa, com um passe no microfluidizador. Emulsões estáveis foram produzidas e a utilização do tratamento H2 afetou bastante as propriedades da emulsão e dos filmes formados, demonstrando que a técnica de homogeneização utilizada interfere nas características do material final.

Diferentes autores combinaram a utilização de emulsificantes com altas velocidades de homogeneização, resultando em dispersões filmogênicas estáveis. O emulsificante mais utilizado foi o Tween 80, previamente misturado ao óleo ou adicionado diretamente à solução polimérica antes da incorporação dos OEs, sendo o ultraturrax o equipamento adotado para realizar a homogeneização (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012; GRANDE-TOVAR et al., 2018; JOUKI et al., 2014).

## 2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, foram descritas as funções dos curativos, bem como a utilização de biopolímeros na área biomédica como substituintes parciais dos materiais sintéticos. Evidenciou-se que a quitosana e o alginato são biopolímeros que vêm sendo amplamente estudados para aplicações biomédicas e farmacêuticas, sendo descritos diferentes estudos da aplicação de filmes compósitos de alginato e de quitosana como curativos, demonstrando o grande potencial da combinação desses polímeros e dessa estrutura como alternativa viável e promissora para a aplicação.

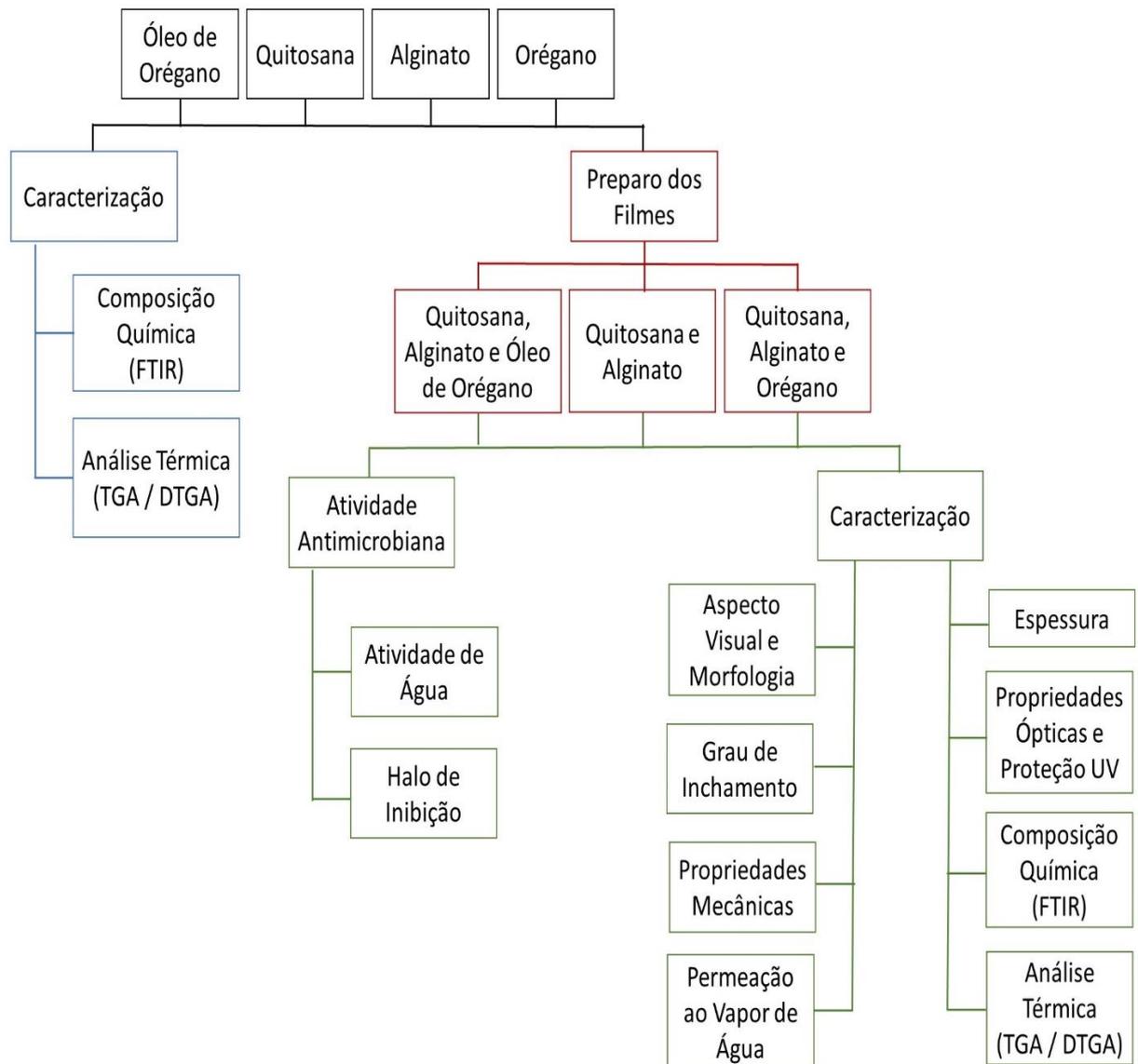
Também foram abordadas pesquisas em relação à produção e utilização de filmes ativos como curativos, bem como a utilização de agentes antimicrobianos naturais como os óleos essenciais para alcançar tal propriedade, descrevendo suas características e incorporação em matrizes poliméricas. Especificamente, buscou-se relatar a utilização do óleo essencial de orégano como composto ativo nos filmes e seu espectro de ação antimicrobiana. Além disso, foram apresentadas as características gerais do orégano, porém, não foram encontrados estudos relativos à sua utilização direta para produção de filmes e sua atividade antimicrobiana, interessante para redução de processamento necessário para a extração do composto bioativo.

Nesse contexto, o presente trabalho que trata do desenvolvimento de filmes ativos à base de quitosana e alginato incorporados com agentes antimicrobianos naturais (folhas de orégano e seu óleo essencial) pretende contribuir para a produção de curativos biopoliméricos com propriedades bioativas. Adicionalmente, pretende-se contribuir com a redução dos custos, tanto relacionados ao óleo em si quanto relativos ao processamento necessário para a obtenção do óleo, comparando a utilização do óleo essencial e do seu precursor sólido (folhas de orégano moídas) sem a necessidade da etapa de extração. Vale ressaltar que um estudo avaliando a utilização das folhas de orégano cominuído como agente antimicrobiano em filmes para curativo pode ser importante e contribuir para avanços na área, auxiliando no desenvolvimento de trabalhos futuros. Além disso, a utilização de polímeros naturais e biodegradáveis para a produção dos filmes também pode contribuir para a redução do impacto ambiental.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo tem por objetivo a apresentação da metodologia empregada na realização do presente trabalho a partir da descrição dos materiais e equipamentos utilizados, além do detalhamento das técnicas e procedimentos experimentais aplicados. Para uma melhor compreensão da metodologia adotada, na Figura 9 é apresentado um fluxograma com as etapas realizadas ao longo do trabalho.

Figura 9 - Fluxograma das etapas envolvidas no trabalho: desenvolvimento e caracterização dos filmes ativos.



### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Biopolímeros: quitosana e alginato

Para o preparo das soluções necessárias para a obtenção dos filmes foram utilizados quitosana (baixa massa molar, grau de desacetilação de 75-85 %) e alginato de sódio (viscosidade de 15 - 25 cP, 1 % em água) comerciais, marca Sigma-Aldrich (Missouri, EUA).

#### 3.1.2 Agentes antimicrobianos

Folhas de orégano secas adquiridas em mercado local (Porto Alegre, RS) e óleo essencial de orégano (56,78 % carvacrol e 5,08 % timol, segundo o fabricante, e massa específica de 0,9447 g mL<sup>-1</sup>, conforme análise apresentada no Apêndice A) obtido da France-Lavande (Montguers, França) foram utilizados como compostos bioativos.

#### 3.1.3 Reagentes

Ácido láctico P. A. (Êxodo Científica, Brasil) foi utilizado na solubilização da quitosana. Glicerol de grau analítico (Dinâmica, Brasil) foi utilizado como plastificante e cloreto de cálcio anidro P. A. (Dinâmica, Brasil) foi utilizado no preparo da solução reticulante. Para as formulações com óleo, Tween 80 (Dinâmica, Brasil) foi utilizado como emulsificante. Na preparação da solução salina para os testes de grau de inchamento dos filmes, foram utilizados os reagentes cloreto de cálcio dihidratado P. A. (Dinâmica, Brasil) e cloreto de sódio 99,5 % P. A. (Química Moderna, Brasil).

#### 3.1.4 Caracterização dos biopolímeros e agentes antimicrobianos

A caracterização dos biopolímeros e dos agentes antimicrobianos foi realizada visando a comparação e avaliação da estrutura química e estabilidade térmica dos filmes formados a partir desses compostos. As análises foram realizadas

na Central Analítica do Departamento de Engenharia Química da UFRGS. Nos itens que seguem, estão apresentadas as metodologias adotadas para essas análises.

#### 3.1.4.1 Estrutura química

A quitosana, o alginato, o orégano e o óleo essencial de orégano tiveram sua estrutura química avaliada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrômetro SpectrumModel 1000 (Perkin Elmer, EUA). Os espectros foram obtidos no modo reflexão atenuada (UATR), com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e média de 64 varreduras, na faixa de  $4000$  e  $650\text{ cm}^{-1}$ .

#### 3.1.4.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A quitosana, o alginato e o orégano foram avaliados quanto à sua estabilidade térmica por termogravimetria. A análise foi conduzida utilizando o equipamento TA Instrument - Waters, modelo SDT Q600 (EUA), sendo as amostras aquecidas de  $25\text{ °C}$  até  $700\text{ °C}$  a uma taxa de aquecimento de  $10\text{ °C min}^{-1}$ , sob atmosfera de nitrogênio ( $100\text{ mL min}^{-1}$ ). Para o óleo essencial de orégano, utilizou-se dados apresentados na literatura, não sendo realizado o TGA para este composto.

### 3.2 OBTENÇÃO DOS FILMES

As soluções poliméricas, suspensões e filmes, para todas as formulações estudadas, foram produzidos no Laboratório de Tecnologia de Embalagens e Desenvolvimento de Membranas (LATEM) e no Laboratório de Separação por Membranas (LASEM), ambos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### 3.2.1 Solubilização dos biopolímeros

Soluções poliméricas de quitosana  $1\%$  (m/m) em meio ácido e alginato  $0,5\%$  (m/m) em água, foram preparadas para a obtenção dos filmes. A quitosana foi solubilizada em solução aquosa de ácido láctico ( $1\%$  v/v) sob agitação à temperatura

ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 16 h. O ácido lático foi escolhido como solvente tendo em vista seu caráter plastificante em relação à quitosana, visando a conferência de maior maleabilidade aos filmes para maior conforto na utilização como curativo. O alginato foi solubilizado em água destilada sob agitação, nas mesmas condições de temperatura, durante 3 h.

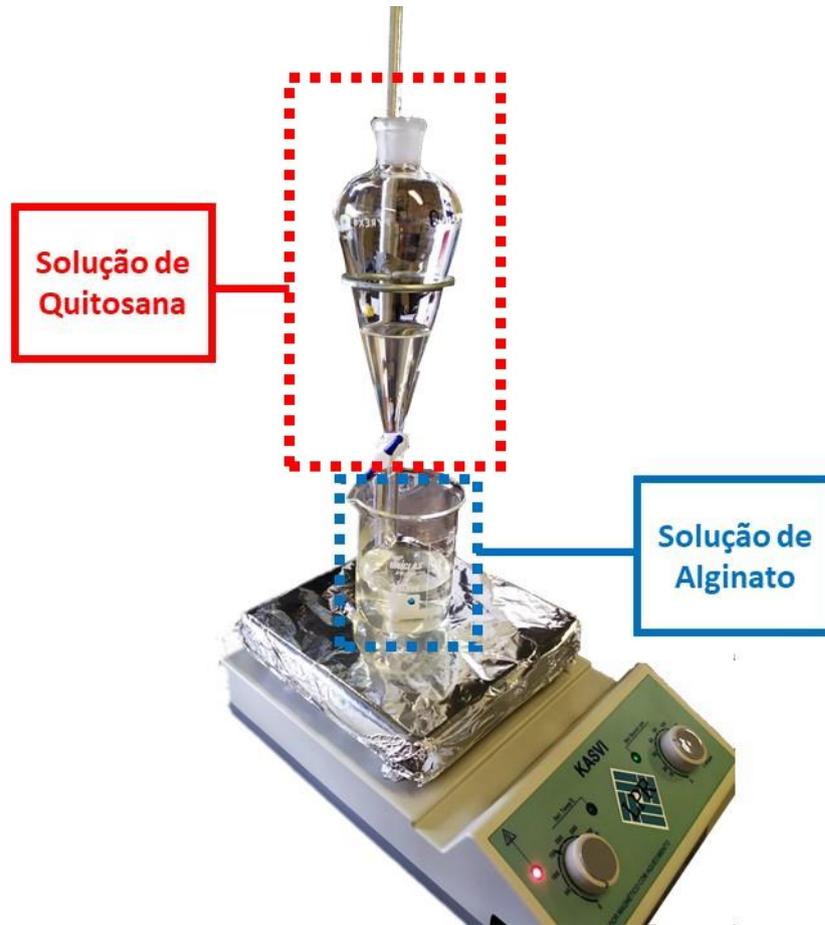
### 3.2.2 Filmes compostos de quitosana e alginato

A metodologia adotada para o preparo da suspensão filmogênica foi adaptada de Bueno et al. (2014). A solução de quitosana foi adicionada à solução de alginato por gotejamento, utilizando um funil de separação, a uma vazão de 200 mL h<sup>-1</sup>, sob agitação de 500 rpm. Terminada a adição da solução de quitosana, a mistura foi mantida sob agitação a 1000 rpm por 10 minutos para homogeneização. As soluções poliméricas continham a mesma massa de polímero (0,5 g) e foram misturadas em uma proporção de 2:1 (100 g de solução de alginato e 50 g de solução de quitosana). Dessa forma, a concentração das soluções poliméricas utilizadas foi diferente, porém, a proporção entre os polímeros após a mistura foi de 1:1, totalizando 1 g de polímero na suspensão final. O sistema utilizado para o gotejamento da solução de quitosana e para a homogeneização da suspensão polimérica está apresentado na Figura 10.

Após o processo de mistura inicial, a suspensão foi submetida à agitação em ultraturrax (IKA T18, Multitec) a 15500 rpm: após 4 minutos de agitação, foram adicionados 0,5 g de glicerol (50 % m/m<sub>polímero</sub>) (agente plastificante) e, transcorrido mais 1 minuto, foram adicionados 1,5 mL de solução de cloreto de cálcio 2 % (m/m) (agente reticulante), mantendo-se a suspensão sob agitação durante 5 minutos para ocorrer a reticulação polimérica, totalizando 10 minutos de mistura no ultraturrax. Em seguida, aplicou-se vácuo na suspensão polimérica utilizando uma bomba de vácuo (TE-058, Tecnal, Brasil) até a completa remoção das bolhas de ar visíveis a olho nu.

A suspensão foi então disposta e pesada em placas de Petri de poliestireno cristal, utilizando o método de *casting*, aplicando-se uma gramatura de 0,53 g cm<sup>-2</sup>. As placas com a suspensão espalhada foram colocadas em estufa com convecção forçada (DeLeo, Brasil) a 40 °C durante 24 h para a secagem. Os filmes foram armazenados em câmara com umidade relativa controlada (55 %) e temperatura ambiente (~ 25 °C), até a realização das análises para sua caracterização.

Figura 10 – Sistema utilizado para mistura e homogeneização das soluções poliméricas de quitosana e alginato.



### 3.2.3 Preparação dos filmes compostos de quitosana e alginato contendo óleo essencial de orégano

Os filmes contendo óleo essencial de orégano foram preparados a partir de três formulações distintas, tomando como base a massa de suspensão polimérica (~150 g): 0,25 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{suspensão}}$ ); 0,5 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{suspensão}}$ ) e 1 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{suspensão}}$ ). Para promover uma melhor emulsificação do óleo, o reagente Tween 80 foi utilizado em uma proporção de 0,250 g/g<sub>óleo</sub>.

A metodologia adotada para a mistura das soluções poliméricas de quitosana e alginato foi a mesma descrita na seção 3.2.2. Após a mistura das soluções e sua homogeneização, a suspensão foi submetida à agitação em ultraturrax (IKA T18, Multitec) a 15500 rpm, sendo imediatamente adicionadas as quantidades de emulsificante e de óleo essencial de orégano adequadas a cada formulação, mantendo-se a agitação por 4 minutos para que se formasse uma emulsão estável.

Após esse tempo, ainda sob agitação, foram adicionados 0,5 g de glicerol (50 % m/m<sub>polímero</sub>) como plastificante e, transcorrido mais 1 minuto, foram adicionados 1,5 mL de solução de cloreto de cálcio 2 % (m/m) como agente reticulante, mantendo-se a suspensão sob agitação durante 5 minutos para a ocorrência da reticulação polimérica, totalizando 10 minutos de mistura no ultraturrax. Em seguida, aplicou-se vácuo na suspensão polimérica emulsionada utilizando uma bomba de vácuo até a remoção completa das bolhas de ar.

A metodologia utilizada para o *casting*, secagem e armazenamento dos filmes com óleo essencial de orégano em sua composição foi a mesma descrita para os filmes compostos de quitosana e alginato (seção 3.2.2).

#### **3.2.4 Preparação dos filmes compostos de quitosana e alginato contendo orégano**

Os filmes contendo orégano foram preparados a partir de duas formulações distintas, tomando como base a massa de polímero (1 g): 10 % (m<sub>orégano</sub>/m<sub>polímero</sub>) e 20 % (m<sub>orégano</sub>/m<sub>polímero</sub>). As folhas de orégano secas foram cominuídas em um moinho de facas (MF 10, IKA Werke) e peneiradas para obter um tamanho de partícula < 60 *mesh*.

A mistura das soluções poliméricas (quitosana e alginato) e a homogeneização da suspensão foram realizadas conforme descrito na seção 3.2.2. A suspensão polimérica foi levada à agitação em ultraturrax (IKA T18, Multitec) a 15500 rpm, sendo imediatamente adicionadas as quantidades de pó de orégano adequadas a cada formulação, mantendo-se a agitação por 4 minutos para a dispersão homogênea dos particulados. Após esse tempo, foram adicionados 0,5 g de glicerol (50 % m/m<sub>polímero</sub>) como plastificante e, transcorrido mais 1 minuto, foram adicionados 1,5 mL de solução de cloreto de cálcio 2 % (m/m) como agente reticulante, mantendo-se a suspensão sob agitação por mais 5 minutos para a ocorrência da reticulação polimérica, totalizando 10 minutos de mistura no ultraturrax. Em seguida, aplicou-se vácuo na suspensão obtida utilizando uma bomba de vácuo até que, visualmente, não fosse mais possível identificar bolhas.

A metodologia utilizada para o *casting*, secagem e armazenamento dos filmes com orégano em pó foi a mesma descrita para os filmes compostos de quitosana e alginato (seção 3.2.2).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Os filmes desenvolvidos foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, mecânicas, ópticas, térmicas e de barreira, bem como quanto à sua morfologia e estrutura química, conforme descrito nos itens a seguir.

#### 3.3.1 Aspecto visual e morfologia

Para a avaliação do aspecto visual dos filmes foi realizado um registro fotográfico das amostras. A análise de morfologia foi feita por microscopia óptica (Bioptika B100 series) com magnificação de 5x, no modo transmitância, no LATEM.

#### 3.3.2 Espessura

As análises de espessura foram realizadas em 8 amostras de cada formulação. Para cada amostra, a espessura foi medida em 6 pontos aleatórios usando um micrômetro digital (Mitutoyo, Japão). Esse procedimento foi realizado em triplicata, no LASEM.

#### 3.3.3 Grau de inchamento

Para a análise do grau de inchamento (capacidade de absorção) foi utilizado o método gravimétrico, avaliando dois líquidos distintos: água destilada e solução salina (0,368 g L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio dihidratado e 8,298 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio). Esta solução salina, segundo Xie et al. (2018), simula a parte inorgânica do exsudato de feridas.

O método gravimétrico considera a massa inicial (seca) de uma amostra e sua massa após 24 h de imersão. Para cada formulação, cinco amostras (4 cm<sup>2</sup>) foram inicialmente pesadas e imersas no líquido (aproximadamente 80 mL) por 24 h. Posteriormente, o excesso de líquido foi removido com papel absorvente e a massa da amostra foi determinada em balança analítica (ATY224, Shimadzu, Japão), sendo o grau de inchamento dado pela Equação 1. A análise foi realizada em triplicata para cada líquido, no LASEM.

$$\text{Grau de inchamento (\%)} = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

onde  $m_i$  é a massa inicial da amostra seca (g) e  $m_f$  é a massa da amostra após 24 h de imersão no líquido (g).

### 3.3.4 Propriedades ópticas e proteção UV

As propriedades ópticas e de proteção UV dos filmes foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro (T80 UV/VIS, PG Instruments Ltda., Reino Unido) do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA), no Departamento de Engenharia Química da UFRGS. Uma amostra de cada formulação (3 cm x 1 cm) foi colocada em uma cubeta de quartzo e, em seguida, foram determinadas a transmitância e a absorbância da amostra em uma faixa de 200 a 800 nm, com intervalo de 5 nm. Utilizou-se uma cubeta de quartzo vazia como branco. O procedimento foi realizado em triplicata para cada formulação.

A determinação da proteção UV dos filmes foi adaptada da metodologia aplicada por Morales et al. (2019). A partir dos espectros obtidos, avaliando-se os valores de transmitância, foi possível determinar a proteção contra a radiação UV-A (320-400 nm) e UV-B (280-320 nm).

A transparência e a opacidade dos filmes foram determinadas de acordo com a metodologia utilizada por Schaefer et al. (2020), que considera a absorbância a 600 nm para avaliação da opacidade da amostra e relaciona a transparência com a porcentagem de transmitância do material nesse mesmo comprimento de onda. A opacidade dos filmes foi calculada a partir dos espectros de absorção obtidos utilizando a Equação 2.

$$\text{Opacidade} = \frac{Abs_{600}}{x} \quad (2)$$

onde  $Abs_{600}$  é a absorbância da amostra em um comprimento de onda de 600 nm e  $x$  é a espessura da amostra (mm).

### 3.3.5 Estrutura química

Os filmes compostos de quitosana e alginato, bem como aqueles contendo óleo essencial de orégano e orégano em pó tiveram sua estrutura química avaliada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrômetro SpectrumModel 1000 (Perkin Elmer, EUA) da Central Analítica do Departamento de Engenharia Química da UFRGS. Os espectros foram obtidos no modo reflexão atenuada (UATR), com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e média de 64 varreduras, na faixa de  $4000$  e  $650\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.3.6 Análise termogravimétrica (TGA)

Os filmes obtidos a partir das diferentes formulações foram avaliados quanto à sua estabilidade térmica por termogravimetria. A análise foi conduzida utilizando o equipamento TA Instrument - Waters, modelo SDT Q600 (EUA) da Central Analítica do Departamento de Engenharia Química da UFRGS, sendo as amostras aquecidas de  $25\text{ °C}$  até  $700\text{ °C}$  a uma taxa de aquecimento de  $10\text{ °C min}^{-1}$ , em atmosfera de nitrogênio ( $100\text{ mL min}^{-1}$ ).

### 3.3.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes desenvolvidos foram avaliadas de acordo com a ASTM (*American Society for Testing and Materials*), segundo o método D882-18 (ASTM, 2018), aplicável à determinação das propriedades de tração de filmes com espessuras menores a  $1\text{ mm}$ . O equipamento utilizado para a realização das medidas foi um analisador de textura TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), com célula de carga de  $50\text{ N}$ , do Laboratório de Análise de Propriedades Físicas de Alimentos (LAPFA) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Os filmes foram cortados em amostras retangulares ( $70\text{ mm}$  de comprimento e  $25\text{ mm}$  de largura) e alocados no equipamento utilizando um espaçamento inicial entre as garras de  $50\text{ mm}$ , com velocidade de operação de  $0,8\text{ mm s}^{-1}$ . Com base nos dados fornecidos pelo texturômetro, foi possível obter as curvas de tensão *versus*

deformação que foram usadas para realizar as medidas das propriedades mecânicas das amostras, sendo as propriedades avaliadas a tensão de ruptura (MPa), o módulo de elasticidade ou de Young (MPa) e a alongação (%). A análise foi realizada em triplicata para cada formulação.

### 3.3.8 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e fluxo de vapor de água (FVA)

As análises de permeabilidade ao vapor de água foram realizadas de acordo com a norma ASTM E96 (ASTM, 2016), no LATEM.

Amostras de filmes provenientes das diferentes formulações preparadas foram colocadas em células de permeação, com altura de 22 mm e diâmetro interno de 63 mm, preenchidas com sílica, condição na qual a umidade relativa (UR) é 0 %. As células foram pesadas em balança analítica (ATY224, Shimadzu, Japão) e imediatamente colocadas em uma câmara climática (CL 350, ColdLab, Brasil) com umidade relativa e temperatura controladas (UR = 60 % na T = 25 °C). Após 48 h, o ganho de massa, que representa a massa de água que permeou através do filme, foi avaliado nas células realizando uma nova pesagem. A análise foi realizada em triplicata para cada uma das formulações estudadas. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi determinada utilizando a Equação 3.

$$PVA = \frac{w}{tA} \frac{e}{ps(UR_1 - UR_2)} \quad (3)$$

onde  $w$  é a massa de água que permeou através do filme (g);  $t$  é o tempo de permeação (h);  $A$  representa a área de permeação (m<sup>2</sup>);  $e$  representa a espessura dos filmes (mm);  $ps$  é a pressão de vapor da água na temperatura da câmara climática (kPa);  $UR_1$  é a umidade relativa da câmara climática e  $UR_2$  é a condição de umidade relativa no interior da célula preenchida com sílica (0 %). O termo  $ps(UR_1 - UR_2)$  representa a diferença de pressão de vapor entre os dois lados do filme (kPa).

O fluxo mássico de vapor de água (FVA) pode ser calculado a partir dos resultados para a PVA, resultando na Equação 4.

$$FVA = \frac{w}{tA} \quad (4)$$

onde  $w$  é a massa de água que permeou através do filme (g);  $t$  é o tempo de permeação (h) e  $A$  representa a área de permeação ( $m^2$ ).

### 3.4 AVALIAÇÃO DE FATORES ANTIMICROBIANOS DOS FILMES

A avaliação dos fatores antimicrobianos dos filmes, que refletem a atividade antimicrobiana dos filmes desenvolvidos, foi realizada de forma qualitativa, através de medidas da atividade de água das amostras e da inibição do crescimento microbiano promovida pelos filmes, conforme descrito nos itens que seguem.

#### 3.4.1 Atividade de água ( $A_w$ )

A atividade de água dos filmes, fator limitante do crescimento microbiano (TAPIA; ALZAMORA; CHIRIFE, 2007), foi determinada utilizando um medidor de atividade de água (LabMaster-Aw, Novasina, Suíça), operando em temperatura constante (25 °C), com precisão de 0,003 no valor medido. A análise foi realizada em triplicata, no Laboratório Virtual de Predição de Propriedades (LVPP) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS, para cada uma das formulações estudadas.

#### 3.4.2 Inibição do crescimento microbiano

A avaliação da inibição do crescimento microbiano foi realizada através do método de difusão em ágar (disco-difusão), adaptado de Hubner et al. (2020), utilizando duas bactérias, uma Gram-positiva e outra Gram-negativa, a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os ensaios foram realizados no LATEM e no Laboratório de Processamento de Resíduos (LPR) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS. Todo o material utilizado (vidrarias, meio de cultura e de suspensão das bactérias) foi previamente esterilizado em autoclave vertical (Primatec, Brasil) a 121 °C durante 15 minutos.

O ágar *Plate Count Agar* (PCA, Kasvi, Brasil) foi utilizado como meio de cultura para o crescimento de ambas as bactérias. O PCA é um ágar não seletivo que

permite o crescimento de diversas bactérias e é relativamente rico em nutrientes, sendo um meio indicado para análises de disco-difusão (MERCK, 2010).

Uma alça de platina de 1  $\mu\text{L}$  foi utilizada para transferir os microrganismos para 10 mL de solução 0,1 % (m/v) de peptona bacteriológica (Kasvi, Brasil). A alça foi esterilizada em chama antes do contato com os microrganismos.

As suspensões de *S. aureus* e *E. coli* foram homogeneizadas em um vórtex (K45-2810, Kasvi, Brasil) e 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada bactéria em água peptonada foram espalhados, separadamente, em placas de Petri contendo o ágar PCA. Em seguida, discos (3 cm de diâmetro) dos filmes das diferentes formulações, previamente esterilizados por UV durante 30 minutos, foram colocados no centro das placas contendo o ágar e a suspensão. As placas foram levadas à incubação a 37 °C durante 24 h, em incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*, TE381, Tecnal Equipamentos Científicos, Brasil), sendo a avaliação da atividade antibacteriana dos filmes feita a partir da observação da inibição do crescimento das bactérias na porção do ágar em contato direto com o filme e pela formação de um halo de inibição. Os halos formados foram medidos radialmente em 5 pontos aleatórios, da extremidade do filme até o início da região onde era possível observar crescimento das bactérias, utilizando um paquímetro digital (PD150, TMX, Brasil), tomando-se a média dos valores medidos. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada bactéria e para cada formulação.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais obtidos nas análises de caracterização dos filmes (exceto TGA, proteção UV e FTIR), bem como nas análises de atividade antimicrobiana foram avaliados por teste de análise de variância (ANOVA) e teste de diferenças entre médias, utilizando-se o software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA). As comparações foram determinadas pelo teste de Tuckey com nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados alcançados na obtenção e caracterização dos filmes compostos de quitosana e alginato, contendo óleo de orégano, bem como daqueles contendo o pó do orégano em sua composição. Primeiramente, serão apresentados resultados qualitativos referentes à formação do complexo de polieletrólitos a partir da mistura das soluções poliméricas de quitosana e alginato, bem como da incorporação dos agentes antimicrobianos na suspensão polimérica. Na sequência, serão descritos os resultados obtidos nas análises de caracterização dos filmes e nas análises referentes à atividade antimicrobiana das estruturas desenvolvidas.

Para auxiliar na compreensão dos resultados, foi adotada uma nomenclatura para os filmes desenvolvidos ao longo deste trabalho, conforme apresentado na Tabela 1, de acordo com as diferentes formulações, de forma a diferenciar o composto natural com propriedades bioativas utilizado (orégano ou óleo essencial de orégano) e a sua quantidade no filme. Os filmes compostos de quitosana e alginato sem óleo ou orégano cominuído foram tomados como amostras controle ao longo das análises, visando a avaliação da influência da adição dos compostos ativos nas propriedades do material final.

Tabela 1 - Nomenclatura para os filmes compostos de quitosana e alginato, contendo óleo de orégano e orégano na sua composição, em diferentes proporções.

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>Proporção</b>	<b>Nomenclatura</b>
<b>Sem adição</b>	/	CA (controle)
	1 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{solução}}$ )	OEO-1
<b>Óleo essencial de orégano</b>	0,5 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{solução}}$ )	OEO-0,5
	0,25 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{solução}}$ )	OEO-0,25
<b>Orégano</b>	10 % ( $m_{\text{orégano}}/m_{\text{polímero}}$ )	OR-10
	20 % ( $m_{\text{orégano}}/m_{\text{polímero}}$ )	OR-20

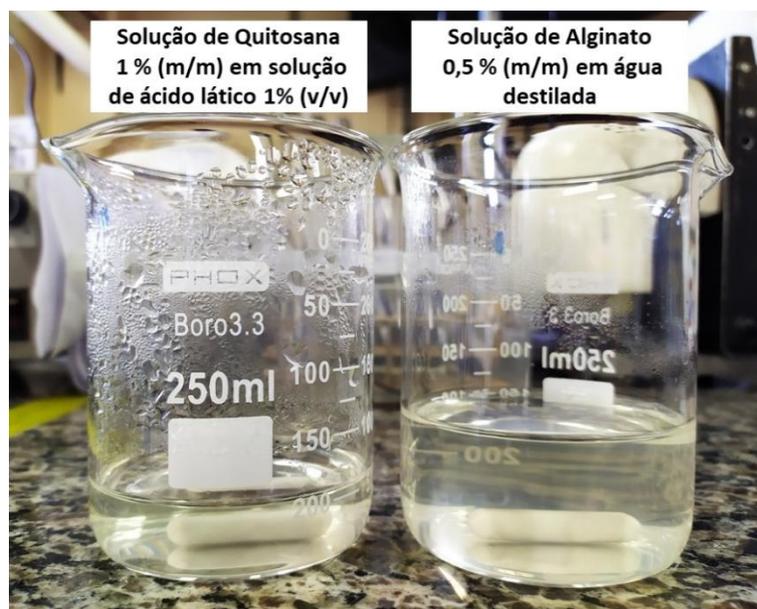
## 4.1 CARACTERÍSTICAS DAS SUSPENSÕES FILMOGÊNICAS

Nesta seção serão apresentadas algumas observações relativas a variações no aspecto da suspensão polimérica ao longo do processo de mistura das soluções dos polímeros e sua homogeneização. Serão, também, descritos os aspectos tanto da dispersão do óleo quanto do pó de orégano nas suspensões poliméricas obtidas através da mistura das soluções de quitosana e alginato.

### 4.1.1 Formação do complexo de polieletrólitos

De acordo com Webster, Huglin e Robb (1997), três sistemas de PECs podem ser obtidos em soluções aquosas: solúveis, coloidais turvos e sistemas bifásicos com líquido sobrenadante e precipitado. Ao longo das etapas de mistura das soluções poliméricas e sua homogeneização foi possível observar mudanças no aspecto da suspensão que podem caracterizar a ocorrência de transição de um tipo de sistema de PECs para outro. Na Figura 11 estão apresentadas as soluções poliméricas de quitosana e alginato antes de serem misturadas.

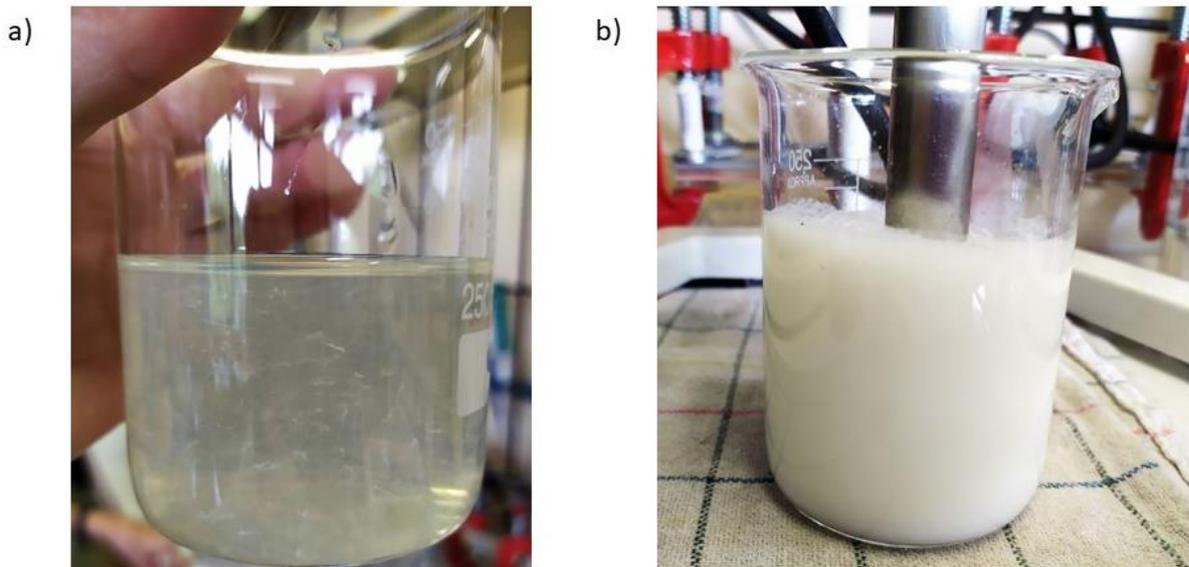
Figura 11 - Soluções poliméricas de quitosana e de alginato.



Observa-se que as soluções poliméricas puras são translúcidas e homogêneas, não apresentando nenhum tipo de precipitado. À medida que a solução

de quitosana foi adicionada à solução de alginato, sob agitação de 500 rpm, foi possível observar o aparecimento de pequenos aglomerados de polieletrólitos, porém, macroscopicamente o sistema permanecia homogêneo, sem modificação na coloração em relação às soluções poliméricas puras, caracterizando um sistema de PECs solúvel, sendo o pH do sistema resultante da mistura das soluções poliméricas de aproximadamente 4. Com o aumento da velocidade de agitação para 1000 rpm, a suspensão tomou aspecto mais heterogêneo, com maiores agregados de polieletrólitos, sendo possível observar alguns filamentos de coloração esbranquiçada, como apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Complexo de polieletrólitos resultante da mistura das soluções de quitosana e alginato, a uma velocidade de agitação de 1000 rpm (a) e 15500 rpm (b).



Esses filamentos brancos indicam precipitação de polieletrólitos, fazendo com que o sistema não seja mais homogêneo. Quando o sistema foi submetido à agitação em ultraturrax, com velocidade de 15500 rpm, a suspensão modificou completamente a sua coloração, passando a ter uma coloração esbranquiçada, bem como a apresentar um precipitado de PECs homogeneamente disperso. A mudança de cor da suspensão pode ser explicada pela formação de um sistema coloidal estável, pois mesmo quando deixada em repouso, não foi observado surgimento de fase líquida translúcida que indicaria precipitação de PECs dispersos. Dessa forma, foi possível observar características de dois sistemas distintos para a mistura final:

sistema coloidal turvo e aglomerados de complexo de polieletrólitos na forma de precipitado homogeneamente disperso no sistema coloidal.

De acordo com Tsuchida e Abe (1982), para soluções poliméricas concentradas, o aumento da temperatura pode fazer com que a solução passe de homogênea para heterogênea, sendo a temperatura um dos parâmetros determinantes do tipo de sistema de PECs obtido. Durante a mistura das soluções poliméricas, foi possível observar que o aumento na velocidade de agitação promoveu um aumento na temperatura da suspensão (não muito elevado, de forma que ainda era possível segurar o recipiente sem necessidade de luvas), devido ao aumento das forças cisalhantes. Desta forma, mesmo para baixas concentrações das soluções poliméricas, a passagem de sistema homogêneo para heterogêneo pode ser devido ao aumento de temperatura no meio, visto que uma modificação nesse parâmetro pode causar mudança do sistema de complexo de polieletrólitos.

A formação da dispersão coloidal pode ser explicada pela elevada velocidade de agitação. Equipamentos como o ultraturrax são capazes de atingir tamanhos de partículas muito pequenos (BONILLA et al., 2012), fato que pode ter promovido a formação de um sistema coloidal estável, com aglomerados de íons e macromoléculas dispersos.

#### **4.1.2 Incorporação dos agentes antimicrobianos na suspensão polimérica**

A dispersão das folhas de orégano cominuídas e do óleo essencial de orégano foi realizada a partir da mesma metodologia de dispersão, utilizando ultraturrax na velocidade de 15500 rpm, porém, para as formulações com óleo, utilizou-se também um emulsificante, de acordo com o descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4 deste trabalho.

A metodologia de dispersão do óleo, para as três concentrações estudadas (1 %; 0,5 % e 0,25 % em relação à massa de suspensão), se mostrou eficiente, visto que foi obtida uma emulsão visualmente estável em todos os casos, não sendo possível observar a separação de fases, mesmo após o repouso da mistura. A emulsão apresentou o mesmo aspecto visual que a suspensão obtida apenas com os polímeros, coloração branca com agregados de íons e macromoléculas dispersos. Não foi observado aumento na quantidade de precipitado, indicando que a

incorporação do óleo e a formação da emulsão não interferiu no sistema de PECs obtido a partir da mistura das soluções poliméricas.

Para a incorporação do orégano em pó, em ambas as concentrações estudadas (20 % e 10 % em relação à massa de polímero), a utilização do ultraturrax a 15500 rpm promoveu uma dispersão visualmente homogênea do particulado na suspensão polimérica. A cominuição prévia das folhas de orégano é importante para a formação do filme, pois quanto menor o tamanho de partícula menor é a sua influência na continuidade da matriz formada, além de aumentar a área de contato do particulado no filme formado com a ferida e favorecer a liberação de compostos ativos devido à ruptura da parede vegetal, que é um impedimento para a migração dos compostos. As quantidades de folhas de orégano cominuídas adicionadas às formulações foram menores do que as quantidades de óleo, tendo em vista que um elevado teor de particulado pode impedir a formação do filme. A adição do orégano alterou a cor da suspensão, levando à uma coloração levemente marrom esverdeado, resultante da mistura entre o branco do sistema de complexo de polieletrólitos e a coloração das folhas da erva.

As emulsões obtidas a partir do óleo essencial de orégano e as suspensões obtidas a partir do pó de orégano diferiram na cor, mas também diferiram no aroma. As emulsões apresentaram odor acentuado e característico do OEO, enquanto a adição do pó de orégano quase não causou modificação no aroma das suspensões, que apresentaram um odor suave e pouco perceptível. Possivelmente, essa diferença tão grande no odor tenha ocorrido, pois, mesmo o orégano sendo uma planta cujas folhas possuem fragrância intensa (KHAN et al., 2018), o óleo apresenta os compostos responsáveis pelo aroma sem o impedimento da parede vegetal, fazendo com que o aroma seja mais acentuado. Além disso, a quantidade de óleo essencial utilizada foi maior que a quantidade de óleo presente no orégano em pó (2 a 6 %, v/m), logo, as emulsões possuíam maior concentração de compostos aromáticos.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para os filmes CA (controle), OR-10, OR-20, OEO-0,5 e OEO-0,25 nos diferentes ensaios de caracterização. Para os filmes OEO-1 foram realizadas apenas algumas análises, uma vez que a quantidade de óleo utilizada foi bastante elevada em relação às outras

formulações com o mesmo composto, sendo maior que a massa total de polímero. Além disso, o valor das propriedades medidas não foi satisfatório, logo, optou-se por não dar seguimento aos estudos com a formulação OEO-1. Desta forma, os resultados obtidos para os filmes OEO-1 estão apresentados no Apêndice B.

Os resultados das caracterizações realizadas para os componentes puros (quitosana, alginato, orégano e óleo de orégano), de acordo com o descrito na seção 3.4.1, serão apresentados nesta seção para fins de comparação e avaliação das características dos filmes obtidos.

Vale ressaltar que não foram encontrados estudos sobre a incorporação de óleos essenciais em matrizes poliméricas compostas de quitosana e alginato. Da mesma maneira, não foi possível encontrar pesquisas relativas à incorporação de orégano em pó em matrizes poliméricas. Dessa forma, a avaliação dos resultados para os filmes contendo OEO foi feita a partir dos resultados apresentados em estudos que tratam da incorporação de óleos essenciais em outras matrizes poliméricas e a avaliação dos resultados para os filmes incorporados com orégano em pó foi realizada a partir dos dados apresentados em trabalhos envolvendo a incorporação de outros compostos naturais, sólidos e insolúveis, na solução filmogênica.

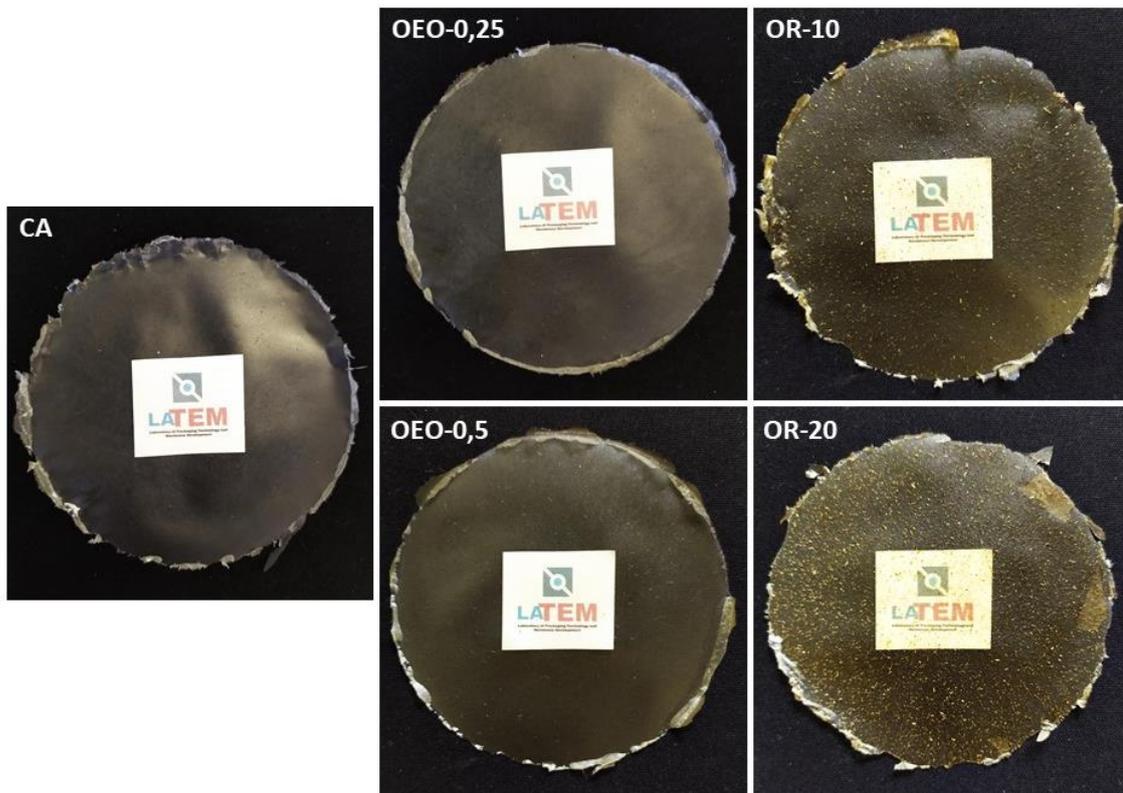
#### **4.2.1 Aspecto visual e morfologia**

Na Figura 13 estão apresentadas as fotografias dos filmes obtidos a partir das diferentes formulações estudadas.

Macroscopicamente, todos os filmes apresentaram características homogêneas, foram transparentes e fáceis de manusear, não apresentando adesividade expressiva. É importante ressaltar que, para todas as formulações, os filamentos precipitados observados na suspensão polimérica foram também aparentes nos filmes e, visualmente, apresentaram-se dispersos de forma homogênea na estrutura. Pode-se verificar que houve mudança de coloração e os filmes contendo orégano em pó ou óleo essencial de orégano em sua composição tornaram-se mais amarelados. Devido ao seu aspecto transparente, é possível afirmar que todos os filmes apresentaram estrutura densa (SCHAEFER et al., 2020), além disso, a metodologia de *casting*, utilizada na obtenção dos filmes, favorece a formação desse tipo de estrutura devido à lenta evaporação do solvente e ao rearranjo das cadeias poliméricas durante a secagem. Visualmente, o orégano em pó se apresentou

homogeneamente disperso nos filmes, corroborando com as observações feitas em relação a homogeneidade aparente da dispersão do particulado nas suspensões poliméricas. Além disso, devido à presença das partículas de orégano (< 60 mesh) na estrutura filmogênica, foi possível observar um aumento na rugosidade superficial aparente para os filmes contendo orégano.

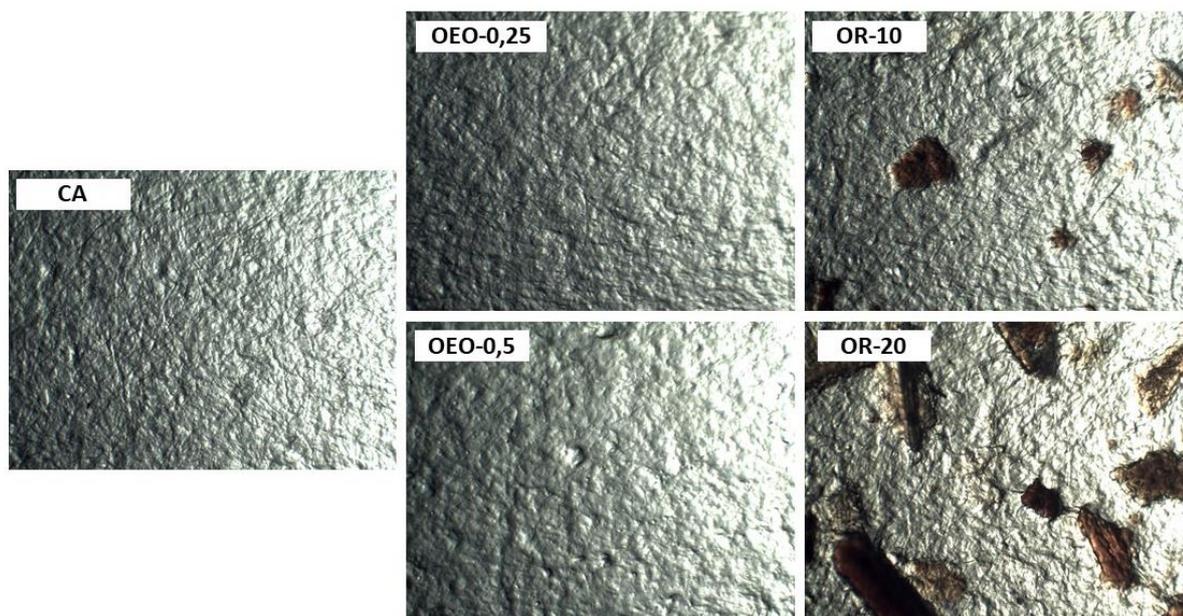
Figura 13 - Fotografias dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano (OR-10 e OR-20); gramatura 0,53 g cm<sup>-2</sup>.



Na Figura 14 estão apresentadas imagens dos filmes obtidas por microscopia óptica, nas quais pode-se observar a morfologia da superfície das amostras. Os filmes controle (CA) apresentaram estrutura filmogênica homogênea, indicando boa compatibilidade entre os componentes, não apresentando defeitos visíveis para a magnificação utilizada. Os filmes contendo OEO apresentaram uma matriz contínua e majoritariamente homogênea, com pequenas irregularidades na superfície (mais aparentes para os filmes OEO-0,5). Esses defeitos podem estar associados à dispersão das gotículas de óleo na estrutura filmogênica, bem como a pequenas porções de óleo que não ficaram agregadas à matriz polimérica e evaporaram durante

a secagem dos filmes (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010; PAGLIONE et al., 2019). Para os filmes com orégano em pó, pode-se verificar nas imagens que a incorporação das folhas cominuídas na suspensão polimérica resultou em uma estrutura filmogênica mais heterogênea. Isso se deve, provavelmente, aos diferentes tamanhos e formas das partículas de orégano, conforme pode ser observado nas imagens. Além disso, embora visualmente o particulado parecesse homogêneo disperso no filme, microscopicamente foi possível observar algumas regiões com maior quantidade de partículas, principalmente para os filmes OR-20.

Figura 14 - Morfologia dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano (OR-10 e OR-20); microscopia óptica, modo transmitância com magnificação de 5x.



#### 4.2.2 Espessura

Os filmes obtidos a partir das formulações desenvolvidas apresentaram diferentes espessuras para a mesma gramatura, exceto os filmes OEO-0,25, que não apresentaram diferença significativa de espessura em relação aos filmes controle. Os valores medidos para a espessura dos filmes estão apresentados na Tabela 2.

Os filmes CA, utilizados como controle, apresentaram espessura de  $65 \pm 5 \mu\text{m}$ . Rodrigues *et al.* (2008), empregando diferentes condições de processamento, obtiveram filmes compostos de quitosana e alginato (proporção

polimérica de 1:1) com espessura média variando de 66 a 80  $\mu\text{m}$ , de acordo com a velocidade de agitação (de 100 a 500 rpm) e vazão para a mistura das soluções poliméricas (de 20 a 40  $\text{mL h}^{-1}$ ), faixa na qual se enquadram os valores obtidos neste trabalho. Outros autores, porém, obtiveram filmes de quitosana e alginato (1:1) mais espessos, com valores entre 80 e 110  $\mu\text{m}$  (BUENO et al., 2014; PIRES et al., 2018). Os valores encontrados no presente estudo são inferiores aos relatados por esses autores, fato que pode ser atribuído a diferenças nas condições de processamento empregadas, bem como nas características dos polímeros. De acordo com Luo e Wang (2014), as propriedades dos PECs formados a partir de polissacarídeos podem ser significativamente afetadas por alterações nas variáveis de processamento e propriedades intrínsecas das matérias-primas.

Tabela 2 - Espessura dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano em pó (OR-10 e OR-20), para a gramatura de 0,53  $\text{g cm}^{-2}$ .

Filmes	Espessura ( $\mu\text{m}$ )
CA	65 $\pm$ 5 <sup>d</sup>
OEO-0,25	67 $\pm$ 5 <sup>d</sup>
OEO-0,5	85 $\pm$ 8 <sup>c</sup>
OR-10	91 $\pm$ 7 <sup>b</sup>
OR-20	110 $\pm$ 6 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na coluna indicam que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A adição de óleo essencial de orégano na composição promoveu mudança significativa na espessura dos filmes, quando comparado aos filmes controle, somente para a formulação com a maior concentração do composto. Os filmes OEO-0,25 não apresentaram diferença de espessura em relação aos filmes controle, sugerindo que a quantidade de óleo adicionada não foi suficiente para alterar a propriedade, enquanto os filmes OEO-0,5 apresentaram um aumento de espessura. De acordo com Bonilla *et al.* (2012), quando o teor de óleo aumenta, pode ocorrer um enfraquecimento das forças de agregação das cadeias poliméricas, tornando a matriz mais aberta e, dessa forma, causando um aumento de espessura no material final. Diferentes autores verificaram que a adição de óleos essenciais, incluindo o de orégano, não

afetou significativamente a espessura de filmes poliméricos (alginato ou quitosana) para concentrações menores que 1 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{solução}}$ ); aumentando a quantidade de óleo, observaram um aumento na espessura dos filmes (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012; BONILLA et al., 2012; GRANDE-TOVAR et al., 2018). O mesmo comportamento para a espessura pôde ser observado no presente trabalho, embora a concentração de óleo para a qual houve esse acréscimo na espessura tenha sido menor do que a descrita na literatura.

A incorporação de orégano em pó na suspensão filmogênica afetou significativamente a espessura do filme obtido com relação ao controle em ambas as concentrações estudadas, elevando o valor dessa propriedade com o aumento do teor de orégano. O mesmo comportamento foi observado por Crizel *et al.* (2018) para filmes de quitosana contendo farinha de bagaço de azeitona, os quais apresentaram incremento de espessura com o aumento do teor de farinha nos filmes. Luchese *et al.* (2018) também reportaram um aumento de espessura de filmes poliméricos pela incorporação de material particulado na solução filmogênica, observando que a adição de resíduo de mirtilo, com diferentes tamanhos de partícula, afetou significativamente a espessura de filmes de amido de mandioca.

Conforme pode ser observado, o filme CA, bem como os filmes contendo óleo apresentaram menores espessuras do que aqueles contendo o orégano cominuído. Esse resultado pode ser explicado pela insolubilidade do orégano em pó na matriz polimérica. Por serem insolúveis no sistema, as partículas do composto natural ficam depositadas na superfície do filme, aumentando a espessura do material final (CRIZEL et al., 2018). Esse resultado corrobora com a observação do aumento da rugosidade superficial aparente dos filmes com orégano descrita anteriormente, bem como com as imagens de morfologia óptica que demonstram maior heterogeneidade para OR-10 e OR-20 em relação às demais estruturas obtidas.

A espessura média dos filmes obtidos no presente trabalho, independentemente da formulação, é menor do que a da pele humana, que pode variar de 0,5 mm a 0,2 mm dependendo da idade, do gênero e do local da pele (MA et al., 2001). De acordo com Pires *et al.* (2018), isso pode ser vantajoso para aplicação como curativo, uma vez que o filmes mais finos são mais confortáveis para o paciente.

### 4.2.3 Grau de inchamento

Os resultados para o grau de inchamento dos filmes, representativo da capacidade de absorção quando em contato com água destilada ou com uma solução salina, que simula o exsudato das feridas, estão apresentados na Tabela 3. Como é possível observar, o grau de inchamento para a maioria dos filmes não foi afetado pelo líquido no qual eles foram imersos, visto que não houve diferença significativa de inchamento do filme quando imerso em água destilada ou em solução salina, exceto para as amostras controle, que demonstraram capacidade de absorção de água maior do que a observada para a solução que simula o exsudato.

Tabela 3 - Grau de inchamento em água e em solução salina, que simula o exsudato de feridas, para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano em pó (OR-10 e OR-20).

Filmes	Grau de inchamento (%)	
	Água Destilada	Solução Salina
CA	184 ± 7 <sup>a,A</sup>	176 ± 11 <sup>a,B</sup>
OEO-0,25	176 ± 14 <sup>a,A</sup>	182 ± 14 <sup>a,A</sup>
OEO-0,5	159 ± 19 <sup>b,A</sup>	143 ± 19 <sup>b,A</sup>
OR-10	183 ± 13 <sup>a,A</sup>	180 ± 12 <sup>a,A</sup>
OR-20	180 ± 13 <sup>a,A</sup>	176 ± 10 <sup>a,A</sup>

\*Letras minúsculas diferentes nas colunas e letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

O valor obtido para os filmes CA, em ambos os líquidos estudados, está dentro da faixa relatada por Meng et al. (2010). Em seu estudo, os autores avaliaram o grau de inchamento de filmes formados por PEC de quitosana e alginato em diferentes soluções salinas, obtendo valores entre 95 % e 295 % para a propriedade.

A adição de óleo essencial de orégano afetou o grau de inchamento, em comparação à formulação controle, somente para a maior concentração de óleo estudada, não havendo diferença significativa na propriedade entre os filmes CA e OEO-0,25. Esse resultado indica que a quantidade do óleo adicionada não foi

suficiente para reduzir a afinidade do material com a água. Os filmes OEO-0,5 apresentaram grau de inchamento significativamente menor do que os filmes CA, indicando menor capacidade de absorção de água, possivelmente devido à diminuição da hidrofiliidade ocasionado pela elevação do teor de óleo nas amostras. Resultados semelhantes para o caráter hidrofílico de filmes compostos de quitosana, amido e pectina com óleos essenciais (de alecrim e hortelã) foram relatados por Akhter et al. (2019), que observaram uma redução na capacidade de absorção de água para os filmes com teor de 0,5 % (m/m) de óleo essencial de alecrim ou hortelã. É importante ressaltar que essa redução no grau de inchamento não indica, necessariamente, que esses filmes (OEO-0,5) sejam menos adequados para aplicação como curativo do que os filmes controle, pois ainda podem absorver o excesso de exsudatos da ferida e fornecer um ambiente adequado à cicatrização (HUBNER et al., 2020; SHOJAEE et al., 2015).

O inchamento das amostras não foi afetado pela incorporação do orégano na matriz polimérica, visto que as formulações OR-10 e OR-20 não apresentaram diferença significativa no inchamento em relação aos filmes controle. Esse resultado indica que a quantidade adicionada de orégano em pó parece não ter sido suficiente para promover alterações nas propriedades de absorção e hidrofiliidade do material. Comportamento semelhante foi encontrado por Schaefer et al. (2020) para filmes compostos de quitosana e amido com incorporação de açafrão.

A absorção de água em um curativo deve evitar uma desidratação excessiva da ferida e o acúmulo de exsudato, mantendo um ambiente adequado para a cicatrização. Curativos com capacidade de absorção de água moderada, em torno de 200 %, são capazes de manter um ambiente úmido e absorver o excesso de exsudato, sendo adequados para cicatrização de feridas (HUBNER et al., 2020; SHOJAEE et al., 2015). Dessa forma, os valores de grau de inchamento obtidos para os filmes desenvolvidos neste trabalho estão de acordo com o recomendado para aplicação como curativos para ferimentos com exsudação moderada, não sendo indicados para feridas com liberação excessiva de líquidos, caso no qual se faz necessário um curativo com alta capacidade de absorção, ou trocas em menores espaços de tempo para manter o ambiente adequado para a cicatrização (DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016; VOWDEN; VOWDEN, 2017).

#### 4.2.4 Propriedades ópticas e proteção UV

As propriedades ópticas dos filmes desenvolvidos estão apresentadas na Tabela 4, onde é possível observar que a absorbância do material cresce com o aumento do teor de orégano em pó e diminui com o aumento da concentração de óleo essencial de orégano no filme. Quanto maior é a transmitância, maior é a transparência da amostra (PAVONI; LUCHESE; TESSARO, 2019).

Embora os filmes apresentassem, visualmente, um aspecto transparente, a porcentagem de transmitância de luz visível foi inferior aos valores descritos na literatura para diferentes materiais considerados translúcidos, para todas as formulações (HAGHIGHI et al., 2019; PAVONI; LUCHESE; TESSARO, 2019; SCHAEFER et al., 2020). Os baixos valores de transmitância na região do UV-Vis e, conseqüentemente, os valores de opacidade do material podem ser explicados, tomando por base os filmes CA, pela presença de filamentos de PEC (aglomerados fibrosos) na estrutura filmogênica (BIERHALZ; WESTIN; MORAES, 2016). Esses filamentos poliméricos, que estão dispersos homogêaneamente no filme, podem ser opacos à luz e, dessa forma, reduzir os valores de transmitância do filme.

Tabela 4 - Propriedades ópticas dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm<sup>-2</sup>.

Filmes	Absorbância	Transmitância (%)	Opacidade
CA	0,524 ± 0,005 <sup>b</sup>	30 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,59 ± 0,07 <sup>a</sup>
OEO-0,25	0,49 ± 0,04 <sup>bc</sup>	32 ± 3 <sup>b</sup>	6,12 ± 0,52 <sup>b</sup>
OEO-0,5	0,41 ± 0,04 <sup>c</sup>	39 ± 4 <sup>a</sup>	4,56 ± 0,43 <sup>c</sup>
OR-10	0,59 ± 0,06 <sup>b</sup>	26 ± 4 <sup>bc</sup>	5,84 ± 0,62 <sup>b</sup>
OR-20	0,71 ± 0,04 <sup>a</sup>	20 ± 2	6,13 ± 0,3 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes nas colunas indicam que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

\*\*Valores de absorvância e porcentagem de transmitância para o comprimento de onda de 600 nm.

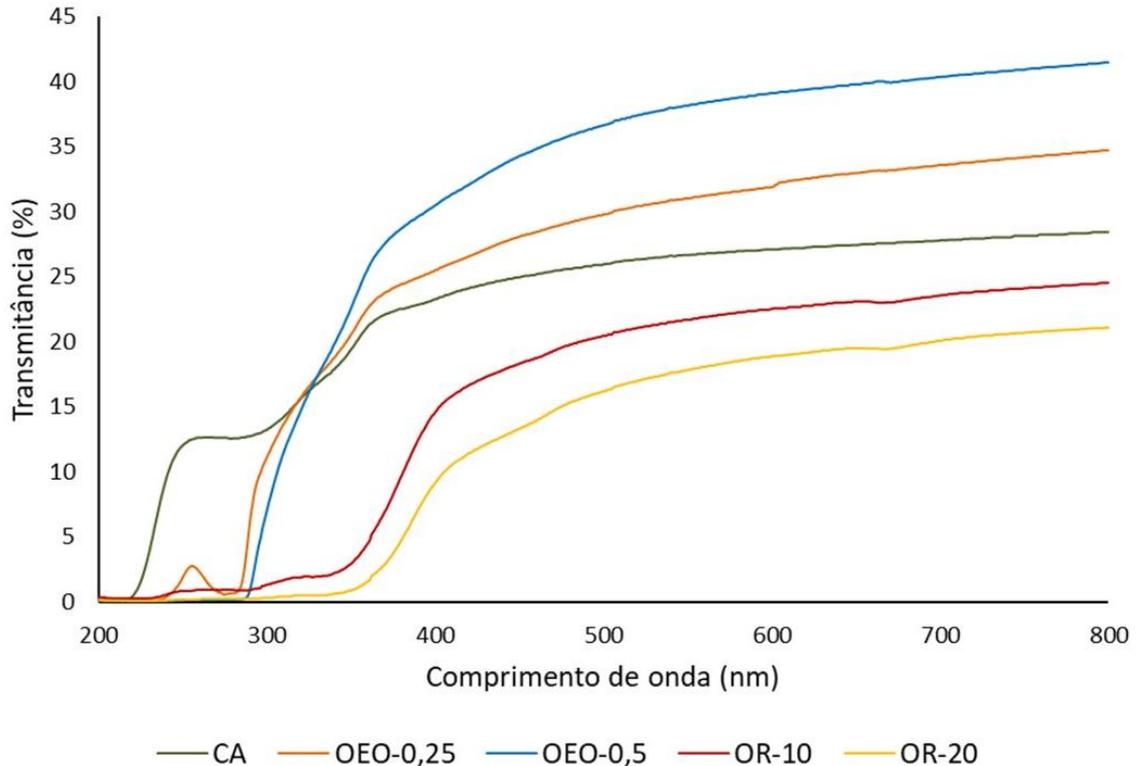
Os filmes contendo óleo essencial de orégano apresentaram menor opacidade do que os filmes controle, isto é, maior transparência, embora uma diferença significativa no valor de transmitância tenha sido observada somente para a

formulação OEO-0,5. Souza et al. (2017) relataram resultados semelhantes para filmes de quitosana contendo diferentes óleos essenciais, observando a tendência de redução da opacidade do material devido à adição de óleo na formulação. De acordo com os autores, esse comportamento pode ser explicado pela formação de uma estrutura mais aberta, causada pela interrupção da matriz polimérica devido à presença das gotículas de óleo inseridas entre as cadeias de polímero, facilitando a passagem de luz visível, logo, tornando o material mais transparente.

A adição de orégano em pó na estrutura filmogênica reduziu a transmitância na faixa do UV-Vis dos filmes com maior teor do composto, indicando que o material se tornou menos transparente, e não afetou significativamente a propriedade para a formulação OR-10. Porém, os valores obtidos para a opacidade dos filmes que continham orégano foram menores do que para as amostras CA, podendo esse comportamento ser explicado pela diferença de espessura entre os materiais. A absorvância dos filmes OR-10 não apresentou diferença em relação ao controle, enquanto os filmes OR-20 tiveram valores significativamente maiores, demonstrando sua menor transparência e corroborando com o obtido para a transmitância. A opacidade é diretamente proporcional à absorvância e inversamente proporcional à espessura e, como os filmes OR-10 e OR-20 são mais espessos do que os CA, o efeito da diferença de espessura se sobressaiu à absorvância, fazendo com que os valores de opacidade do material fossem menores, embora os resultados obtidos para a transmitância indiquem que os filmes eram menos transparentes do que o controle.

Nas curvas que relacionam o valor da transmitância (%) com o comprimento de onda na faixa de 200 a 800 nm (Figura 15), é possível observar o comportamento de barreira contra a luz dos diferentes filmes desenvolvidos. Na região do UV-Vis, como mencionado anteriormente, adição de óleo essencial promoveu redução e a adição de orégano promoveu aumento na propriedade de barreira. Para a faixa entre 400 e 320 nm, região do espectro correspondente à radiação UV-A, pode-se observar uma queda acentuada na transmitância dos filmes contendo OEO e orégano e os valores se mantêm baixos ao longo da região entre 320 e 280 nm, correspondente à radiação UV-B.

Figura 15 – Curvas de transmitância (%) por comprimento de onda dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm<sup>-2</sup>.



Os filmes contendo óleo essencial de orégano apresentaram valores de transmitância próximos aos do filme controle para a região UV-A do espectro, mas para a região UV-B, ocorreu um decréscimo considerável dos valores. A transmitância obtida para os filmes controle, a 280 nm, foi de aproximadamente 13 % e para os filmes OEO-0,25 e OEO-0,5 foi inferior a 1 %, sendo próxima de 0 % para a amostra com maior concentração de óleo. Esse resultado indica que o OEO conferiu melhora nas propriedades de barreira do material contra radiação UV-B, sendo maior a proteção quanto maior o teor de OEO.

Os filmes contendo orégano em pó em sua composição apresentaram os menores valores de transmitância em praticamente toda a faixa de comprimentos de onda estudada. Esse resultado indica que esses filmes possuem elevada proteção contra radiação UV-B, visto que a transmitância foi menor do que 2 % em comprimentos de onda abaixo de 320 nm e menor que 1 % em 280 nm. Além disso, os filmes contendo orégano não transmitiram mais que 15 % da luz em comprimentos de onda menores que 400 nm e, para o filme com maior concentração de OR, a

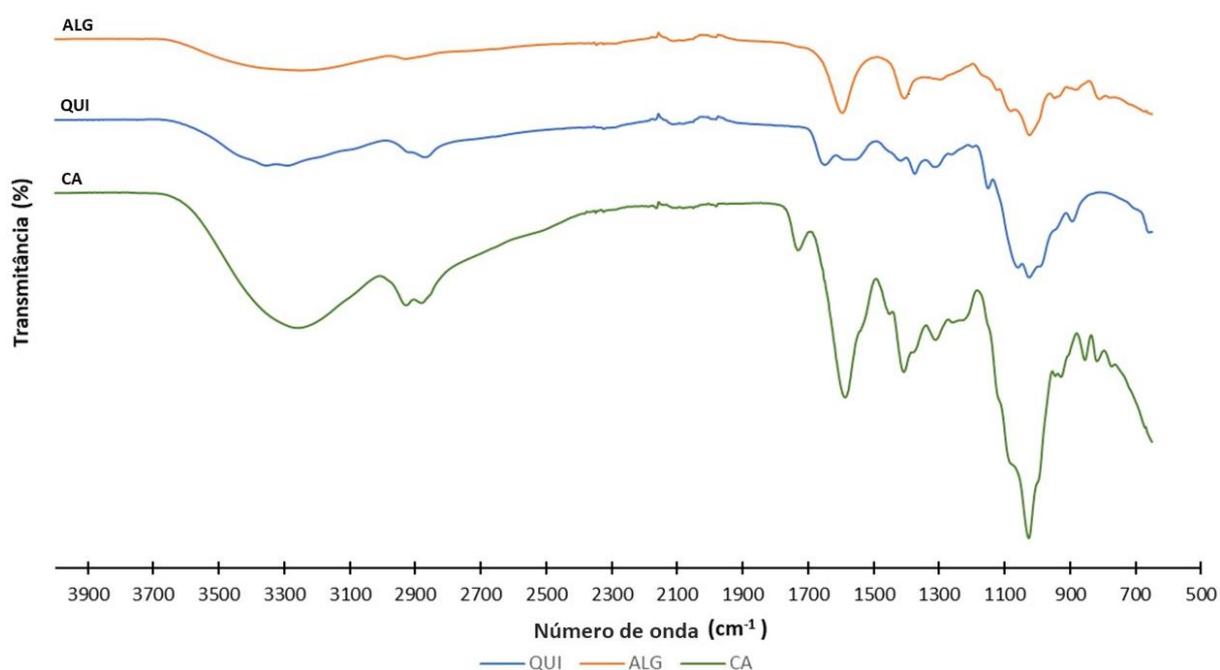
transmitância foi menor do que 1 % a partir do comprimento de onda de 350 nm, indicando que o material também apresenta proteção contra UV-A.

Tanto a adição do óleo essencial de orégano, quanto a adição de orégano na estrutura filmogênica promoveu um aumento na barreira contra radiação UV-B do material em comparação aos filmes CA, que apresentaram valores superiores a 10 % de transmitância entre 320 e 280 nm. Contudo, somente a adição de orégano na estrutura causou aumento na proteção contra UV-A, visto que os valores de transmitância dos filmes controle e dos filmes contendo óleo foram bastante próximos nessa região do espectro. É importante ressaltar que não foram encontrados estudos referentes à proteção UV-A e UV-B de filmes poliméricos contendo óleo essencial de orégano ou orégano em sua composição.

#### 4.2.5 Estrutura química

Os espectros de FTIR para os biopolímeros, quitosana e alginato, bem como para os filmes CA, estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos biopolímeros em pó, alginato (ALG) e quitosana (QUI), e dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA).

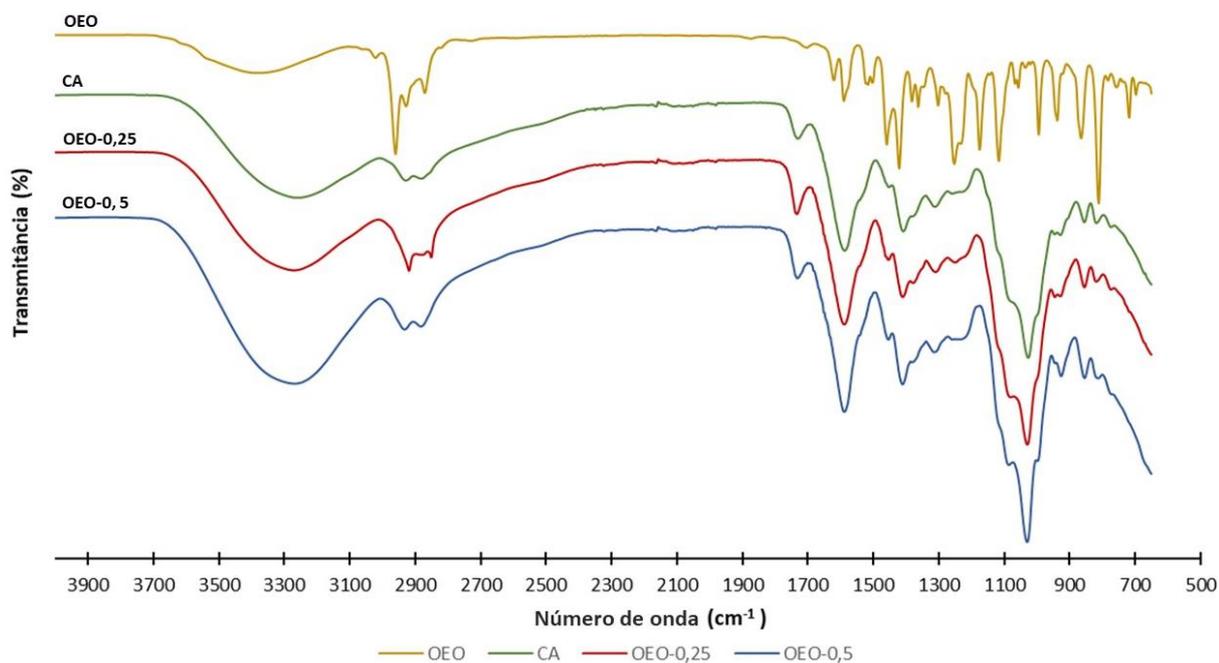


Em todos os espectros é possível observar a banda referente ao OH, entre 3000 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ , representativa da presença de umidade nas amostras e, também, característica de polissacarídeos como quitosana e alginato, além das bandas referentes ao estiramento C-H entre 2850 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  e as bandas referentes à estrutura de polissacarídeos de 900 a 1100  $\text{cm}^{-1}$  (NEGREA *et al.*, 2015; PAVONI, 2018).

No espectro do filme CA há uma banda em 1412  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao grupo carboxilato presente no alginato, bem como em 1715  $\text{cm}^{-1}$ , representativa da vibração C=O do lactato proveniente do ácido láctico utilizado na solubilização da quitosana (LAWRIE *et al.*, 2007). As bandas características dos grupos amino e C=O de amidas da quitosana em 1580  $\text{cm}^{-1}$  e 1650  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, bem como do grupo carboxila do alginato em 1600  $\text{cm}^{-1}$ , podem ser observados nos espectros dos polímeros puros. Entretanto, a proximidade e sobreposição dessas bandas dificultam a identificação individual de cada macromolécula na estrutura dos filmes, ainda que seja possível confirmar a presença de todos pela intensificação das bandas nessa região para o filme CA (NEGREA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2018), sendo seu espectro muito similar a uma sobreposição dos espectros dos polímeros puros, não havendo deslocamento de bandas com relação aos biopolímeros utilizados. Lawrie *et al.* (2007) relataram que os filmes obtidos a partir da mistura de uma solução de quitosana em ácido láctico com uma solução aquosa de alginato de sódio exibiram um espectro de FTIR muito semelhante ao espectro de adição dos dois componentes, como consequência da coprecipitação polimérica (precipitado do complexo de polieletrólitos formado pela quitosana e pelo alginato), corroborando com as observações realizadas no presente trabalho.

Na Figura 17 é possível observar os resultados da análise de estrutura química por FTIR do óleo essencial de orégano, dos filmes controle (CA), apresentado novamente para facilitar a comparação, e dos filmes compostos de quitosana e alginato contendo óleo (OEO-0,25 e OEO-0,5). Todas as bandas presentes nos filmes CA, características dos biopolímeros utilizados na produção dos filmes, também estão presentes nos filmes que apresentam o OEO em sua composição, não havendo surgimento de novas bandas, apenas mudança na intensidade dos picos presentes na formulação sem o composto.

Figura 17 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do óleo essencial de orégano (OEO), filmes compostos de quitosana e alginato (CA) e filmes compostos de quitosana, alginato e óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5).

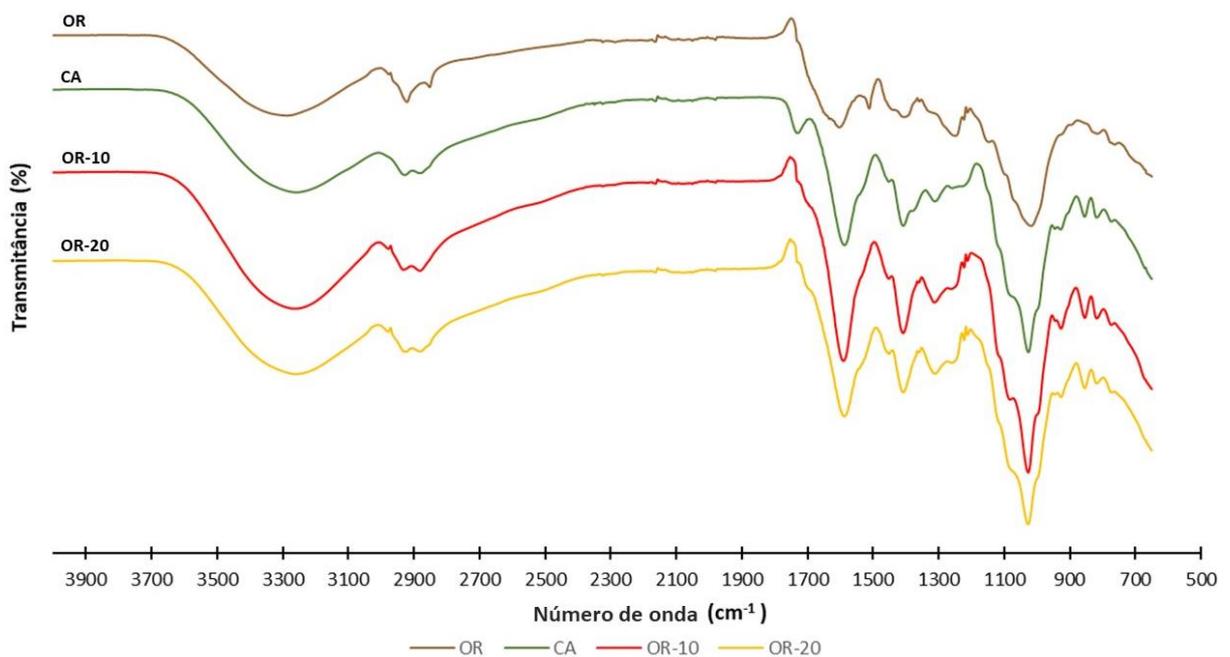


O óleo essencial de orégano apresenta picos característicos do carvacrol, componente majoritário do óleo utilizado, nos comprimentos de onda de 811, 864 e 994  $\text{cm}^{-1}$ , bem como bandas entre 1085 e 1125  $\text{cm}^{-1}$  referentes à vibração de orto-substituição do anel aromático na molécula de carvacrol e um pico a 1600  $\text{cm}^{-1}$  representativo do estiramento C=C (VALDERRAMA; ROJAS DE, 2017). No número de onda de 1450  $\text{cm}^{-1}$  há, para o óleo, uma banda referente a CH<sub>2</sub> (FRAJ et al., 2019). Embora não seja possível observar essas bandas nos espectros dos filmes que contém o óleo (OEO-0,25 e OEO-0,5) devido à sobreposição com as bandas características dos biopolímeros, o aumento da intensidade dos picos nas regiões descritas como representativas do carvacrol é um indicativo da incorporação do óleo essencial de orégano na estrutura filmogênica, sendo maior a intensidade das bandas quanto maior a concentração de óleo no filme.

Comparando os espectros obtidos para os filmes contendo orégano (OR-10 e OR-20) com os espectros do orégano e do filme CA, todos representados na Figura 18, pode-se observar que, da mesma forma que para os filmes com OEO, todas as bandas referentes aos biopolímeros presentes no filme CA estão também presentes nos filmes OR-10 e OR-20 e, devido à sobreposição, ocorreu um aumento

na intensidade dos picos nas regiões que compreendem as bandas características do orégano. Esse composto apresenta bandas em 1400 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos C-O e C-C, típicos de grupos fenil presentes na sua estrutura e também uma banda característica de 1600 a 1740  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde à ligação N-H e ao estiramento C=O representativos de aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos graxos livres e glicerídeos presentes nas folhas dessa planta aromática (BLACK et al., 2016). O aumento na intensidade das bandas nessas regiões para os filmes OR-10 e OR-20 pode ser um indicativo de que houve a incorporação do orégano na estrutura filmogênica.

Figura 18 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do orégano (OR), filmes compostos de quitosana e alginato (CA) e filmes compostos de quitosana, alginato e orégano (OR-10 e OR-20).

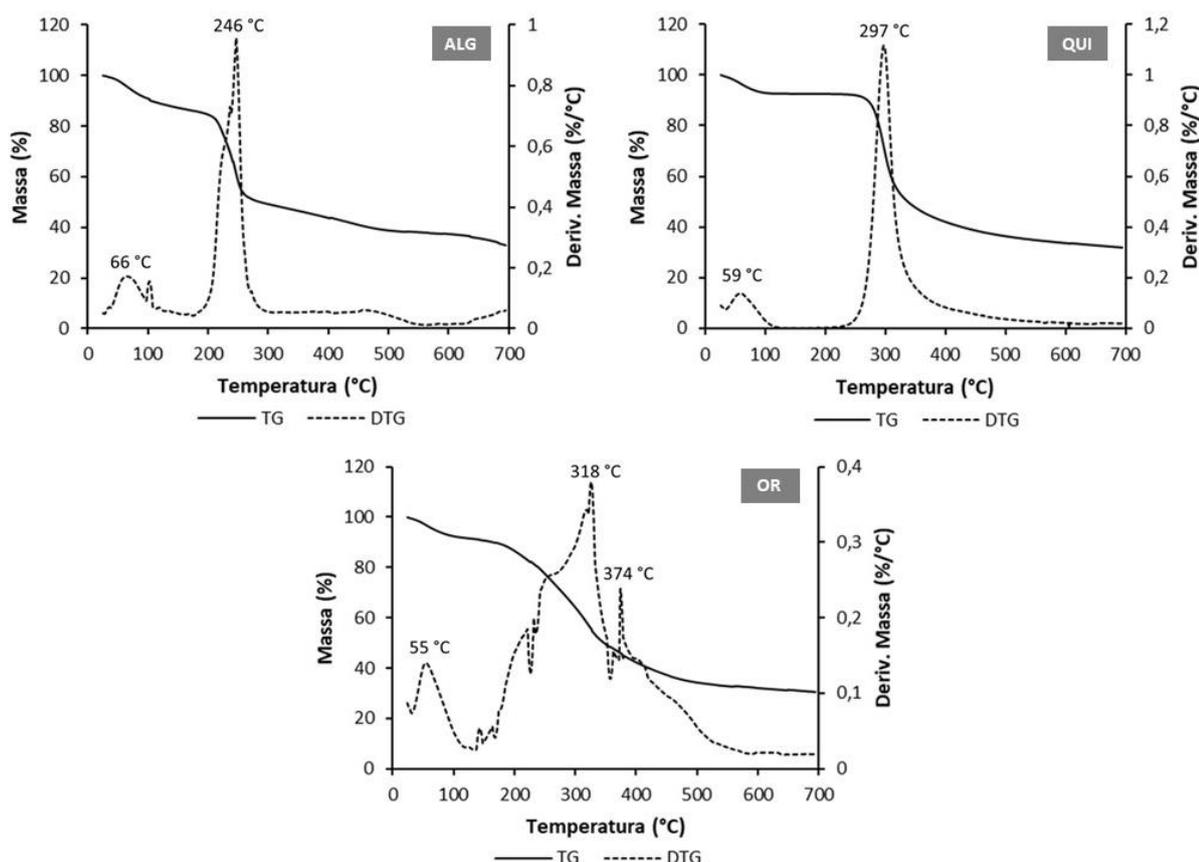


#### 4.2.6 Análise termogravimétrica (TGA)

Na Figura 19 estão apresentados os termogramas dos biopolímeros quitosana e alginato, bem como do orégano, com as curvas de perda de massa (TG) e da derivada da perda de massa (DTG). Nas curvas, é possível observar para os três componentes uma perda de massa entre 25 – 100  $^{\circ}\text{C}$ , correspondente à perda de água absorvida e fracamente ligada ao material. Além da perda de umidade, os

polímeros puros, quitosana e alginato, apresentaram apenas um estágio de perda de massa, indicando que não há interferentes nos polímeros.

Figura 19 - Curvas de TG e DTG para os biopolímeros alginato (ALG) e quitosana (QUI) e para o orégano cominuído (OR); taxa de aquecimento =  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e vazão de  $\text{N}_2 = 100\text{ mL min}^{-1}$ .



A quitosana apresentou uma perda de massa entre  $250 - 350\text{ }^{\circ}\text{C}$  que está associada com a pirólise da matriz polimérica, isto é, com a degradação do biopolímero (MA et al., 2013; MAITRA; SINGH, 2018). A temperatura máxima de degradação, obtida a partir da curva de DTG do material, foi de aproximadamente  $297\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este resultado está de acordo com valores relatados por Laceta et al. (2015) e por Qin, Du e Xiao (2002), que obtiveram temperatura máxima de degradação para a quitosana de  $290\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $298\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. É importante ressaltar que os valores podem variar de acordo com as características intrínsecas da quitosana, como o grau de desacetilação (PAVONI, 2018).

O alginato apresentou sua maior perda de massa entre  $200 - 280\text{ }^{\circ}\text{C}$  correspondente à quebra da estrutura em um produto intermediário que seguiu se

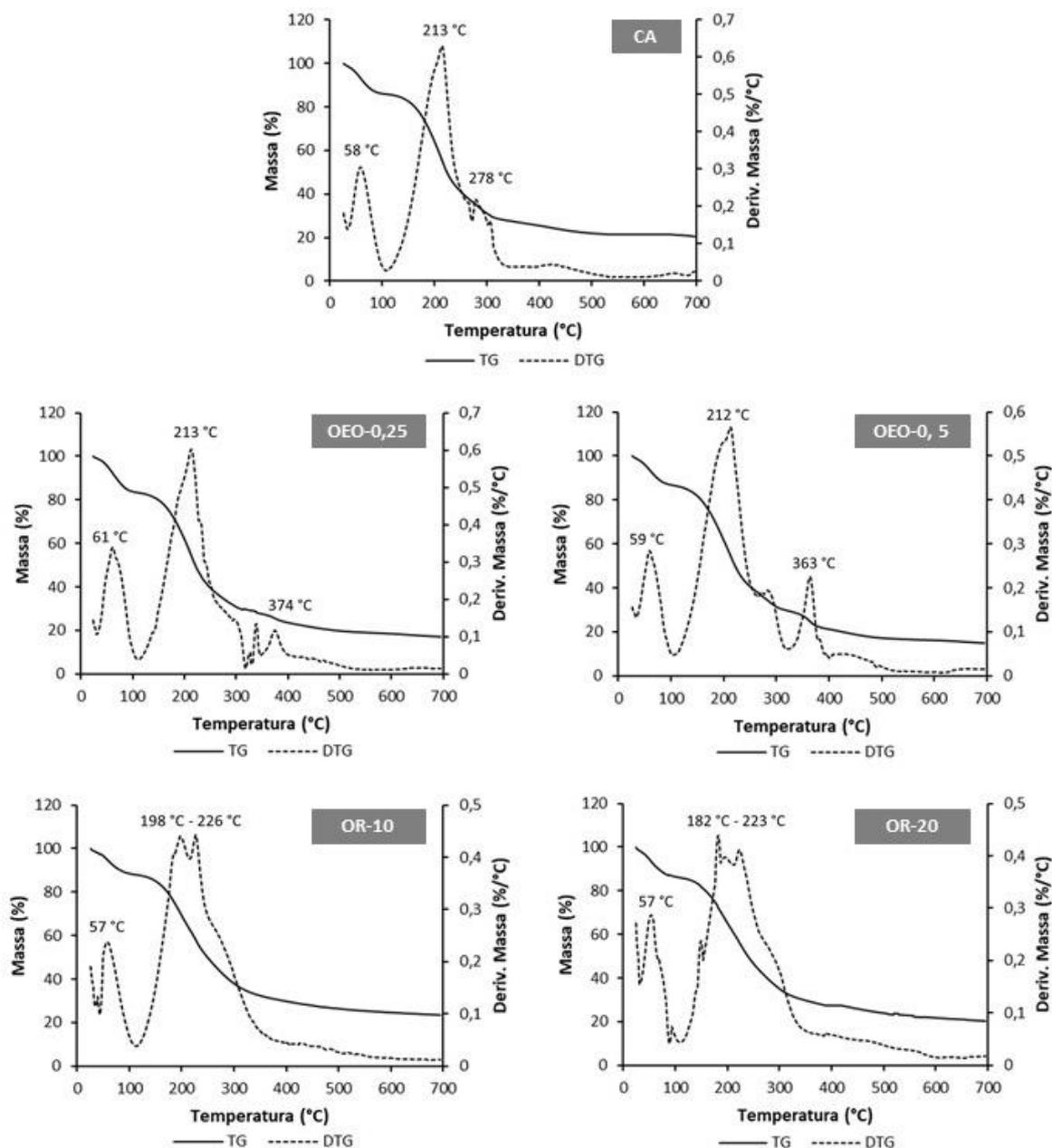
degradando, até a carbonização entre 280 – 550 °C (SHEN et al., 2020). De acordo com a curva de DTG, a temperatura máxima de degradação foi de aproximadamente 246 °C, mesmo valor obtido por Qi et al. (2015) para o alginato de sódio em condições similares de análise.

As curvas de TG/DTG obtidas para o orégano apresentam diversos eventos térmicos, tendo em vista a estrutura vegetal complexa que apresenta diversos componentes em sua composição. Dentre esses eventos, além do relativo à perda de umidade (estágio 1), pode-se destacar dois estágios de perda de massa, um deles ocorrendo entre 185 – 350 °C (estágio 2) e o outro entre 350 – 530 °C (estágio 3), aproximadamente. A principal perda de massa do orégano, observada no estágio 2 com uma temperatura máxima de degradação de 318 °C, pode ser atribuída à degradação das moléculas de celulose e hemicelulose presentes na estrutura vegetal (KUMAR et al., 2019; MERDUN; LAOUGÉ, 2021). A perda de massa observada no estágio 3, com temperatura máxima de degradação de 374 °C, pode ser correspondente à degradação dos compostos orgânicos voláteis formados durante a pirólise da celulose, à degradação de moléculas de lignina, bem como à degradação dos anéis aromáticos presentes na estrutura de compostos como o carvacrol e o timol que fazem parte da composição do orégano, visto que esse evento térmico ocorre em temperaturas próximas a 380 °C (KUMAR et al., 2019; PELISSARI et al., 2009; POLA et al., 2016).

Na Figura 20 estão apresentadas as curvas de TG e de DTG dos filmes obtidos a partir das diferentes formulações estudadas. Nas curvas, é possível observar, para todas as formulações, uma perda de massa entre 25 – 100 °C, correspondente à perda de umidade e de água fracamente ligada ao material.

Para os filmes controle (CA), é possível observar três estágios de perda de massa. O primeiro, como anteriormente mencionado, corresponde à perda de umidade do filme. Os eventos subsequentes, entre 150 – 270 °C e 270 – 310 °C, são relativos à degradação das macromoléculas de alginato e quitosana do complexo de polieletrólitos, respectivamente (TEIXEIRA-COSTA et al., 2020). Em comparação aos biopolímeros puros, observa-se que o filme CA apresentou menor estabilidade térmica, tendo em vista que a degradação do filme composto de quitosana e alginato ocorreu em duas temperaturas, 213 e 278 °C, sendo menor do que a dos biopolímeros puros. Além disso, o resíduo dos filmes CA a 700 °C também foi inferior ao resíduo dos polímeros, também indicando a menor estabilidade dos filmes.

Figura 20 - Curvas de TG e DTG para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20); taxa de aquecimento =  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e vazão de  $\text{N}_2 = 100\text{ mL min}^{-1}$ .



Nas curvas de TG e DTG dos filmes contendo óleo essencial de orégano é possível observar quatro estágios de perda de massa. Os três primeiros, da mesma forma que para os filmes controle, correspondem à perda de umidade e à degradação dos biopolímeros. Os filmes OEO-0,25 e OEO-0,5 apresentaram, respectivamente, a máxima degradação da quitosana em 295 °C e 283 °C e do alginato em 213 °C e 212 °C, demonstrando que a adição do óleo não afetou a estabilidade térmica dos

filmes em comparação às amostras controle (CA). O quarto estágio de perda de massa observado para os filmes contendo OEO, com máximo de degradação entre 360 – 375 °C, pode ser relativo à presença do óleo essencial de orégano na estrutura do material e correspondente à degradação do seu componente majoritário, o carvacrol (PELISSARI et al., 2009; POLA et al., 2016). Quanto maior a concentração de óleo na formulação, maior é a perda de massa observada nessa faixa de temperatura, sendo um indicativo da incorporação do OEO na estrutura filmogênica e corroborando com os resultados obtidos pela análise de FTIR.

Para os filmes contendo orégano, é possível observar que ocorre uma sobreposição das faixas de degradação térmica dos biopolímeros e do orégano. A principal perda de massa desses filmes ocorre aproximadamente entre 135 – 325 °C, que engloba a degradação do orégano e das macromoléculas de quitosana e alginato. A lenta degradação em temperaturas a partir de 350 °C observada para o orégano também pode ser observada para os filmes que contém o composto, sendo mais acentuada para a formulação OR-20, que possui o maior teor de orégano em pó. Não foi possível observar para os filmes, na curva de DTG, o pico relativo ao carvacrol, tendo em vista sua baixa concentração na estrutura quando comparada aos filmes contendo o óleo essencial de orégano.

A análise de estabilidade térmica é importante para a avaliação da temperatura máxima na qual o material pode ser submetido durante o processamento e/ou aplicação, para minimizar a degradação. Tendo em vista que a temperatura de processamento, em operações industriais, varia entre 90 e 130 °C, os resultados da análise termogravimétrica, para todas as formulações, estão dentro da faixa aceitável para aplicação em diferentes áreas, incluindo a biomédica (SCHAEFER et al., 2020).

#### **4.2.7 Propriedades mecânicas**

Conforme resultados das propriedades mecânicas apresentados na Tabela 5, verifica-se que a adição dos compostos naturais com propriedades bioativas na estrutura filmogênica afetou de maneira significativa as propriedades mecânicas do material final obtido. De forma geral, tanto a incorporação do óleo essencial de orégano, quanto a incorporação das folhas de orégano cominuídas, nas suspensões filmogênicas provocaram uma redução na tensão de ruptura, no módulo de Young (MY) e na elongação dos filmes em comparação com as amostras controle.

Tabela 5 – Propriedades mecânicas dos filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm<sup>-2</sup>.

Filmes	Tensão de Ruptura (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Elongação (%)
CA	14 ± 2 <sup>a</sup>	97 ± 22 <sup>a</sup>	52 ± 8 <sup>a</sup>
OEO-0,25	10 ± 2 <sup>b</sup>	63 ± 12 <sup>b</sup>	43 ± 8 <sup>b</sup>
OEO-0,5	8 ± 1 <sup>c</sup>	60 ± 17 <sup>b</sup>	40 ± 5 <sup>bc</sup>
OR-10	7 ± 2 <sup>c</sup>	67 ± 20 <sup>b</sup>	34 ± 8 <sup>c</sup>
OR-20	7 ± 1 <sup>c</sup>	64 ± 19 <sup>b</sup>	34 ± 4 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes nas colunas indicam que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Para filmes compostos de quitosana e alginato (na proporção 1:1) com solução aquosa de cloreto de cálcio 2 % (m/m) como reticulante, a tensão de ruptura variou entre 3 e 31 MPa e o percentual de deformação de 3 a 8 % (BUENO et al., 2014; PIRES et al., 2018; PIRES; MORAES, 2015; RODRIGUES et al., 2008). O valor obtido no presente estudo para a tensão de ruptura dos filmes CA está dentro da faixa descrita na literatura, porém, o percentual de alongação dos filmes compostos de quitosana e alginato se mostrou maior do que os resultados obtidos nos estudos citados, indicando uma maior ductibilidade do material. Esse comportamento pode ser explicado tanto pela adição do glicerol na composição dos filmes, como pela utilização do ácido láctico na solubilização da quitosana. O ácido láctico atua, também, como plastificante da quitosana, fazendo com que os filmes preparados a partir da solubilização desse polímero com o ácido láctico apresentem características como maiores elasticidade e deformação em comparação com aqueles preparados com ácido acético, que é o solvente majoritariamente utilizado para a quitosana (PAVONI; LUCHESE; TESSARO, 2019).

Os filmes CA apresentaram valores de módulo de elasticidade maiores do que os descritos por outros autores. Wang, Khor e Lim (2001) obtiveram valores entre 1 e 1,5 MPa para o módulo de Young de filmes de quitosana e alginato (1:1) com diferentes proporções de agente reticulante (CaCl<sub>2</sub>). Pires et al. (2018) também avaliaram o MY de filmes com mesma proporção desses biopolímeros e solução 2 % de cloreto de cálcio como reticulante, encontrando valores próximos a 2 MPa para

esta propriedade. Esses valores são bastante inferiores em comparação ao obtido no presente trabalho,  $97 \pm 22$  MPa, indicando que os filmes CA apresentam um aumento na rigidez. A discrepância entre os resultados pode ser explicada pelas variações no processo de preparo das suspensões filmogênicas, como a utilização da ultraturrax em uma das etapas de homogeneização das suspensões poliméricas, visto que, como citado anteriormente, as condições de processamento podem afetar de forma significativa as propriedades do material final (LUO; WANG, 2014). Neste caso, a aplicação de alta velocidade de agitação pode ter favorecido a interação das cadeias poliméricas, levando à maior rigidez dos filmes. Outras causas para estas diferenças nos resultados, de acordo com Luo e Wang (2014), podem ser as diferenças nas características da quitosana e do alginato utilizados neste trabalho com relação a outros trabalhos na literatura, tendo em vista que propriedades intrínsecas dos precursores poliméricos como massa molar (utilização de baixa, média ou alta massa molar) e grau de desacetilação da quitosana podem interferir nas características finais do material formado.

A adição de óleo essencial de orégano na estrutura filmogênica levou à redução significativa das propriedades mecânicas, indicando a obtenção de um material menos rígido e com menor resistência à ruptura em comparação aos filmes CA. A tensão de ruptura se mostrou dependente da concentração do componente, sendo menor quanto maior o teor de óleo para a faixa estudada. Contudo, o módulo de elasticidade e o percentual de deformação, embora sejam menores quando comparados aos valores obtidos para as amostras controle (CA), não apresentaram diferenças significativas entre os filmes OEO-0,25 e OEO-0,5.

Paglione et al. (2019), para filmes de concentrado de proteína de soja, relataram que a adição de OEO causou uma redução significativa na tensão de ruptura e no módulo de Young do material, mas não afetou a elongação dos filmes. Segundo os autores, a redução da resistência mecânica do material pode ser explicada pela redução de interação polímero-polímero causada pelo óleo, levando à formação de uma estrutura menos coesa. Benavides, Villalobos-Carvajal e Reyes (2012) avaliaram as propriedades de filmes de alginato incorporados com óleo essencial de orégano, constatando uma redução na tensão de ruptura e um aumento do percentual de deformação dos filmes com a adição e com o aumento da concentração de óleo na formulação.

Os resultados obtidos para a tensão de ruptura e para o módulo de Young para as formulações com OEO estão em concordância com os previamente relatados, porém, divergem para a elongação do material. A incorporação do óleo na estrutura filmogênica causou uma redução no percentual de deformação dos filmes, efeito inverso do que é descrito em trabalhos apresentados na literatura (AGUIRRE; BORNEO; LEON, 2013; PELISSARI et al., 2009). Esse comportamento pode ser explicado pela formação de pontos de fragilidade nos filmes, causados pela presença de gotículas de óleo essencial, originando irregularidades nas estruturas, como pode ser observado nas imagens de microscopia óptica. Esses defeitos geram descontinuidades na matriz polimérica (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010), facilitando a ruptura do material e conseqüentemente levando à fratura prematura com redução do percentual de elongação.

A incorporação das folhas de orégano em pó também promoveu uma redução nas propriedades mecânicas dos filmes em comparação às amostras controle. Porém, os valores obtidos para tensão de ruptura, MY e percentual de deformação para as amostras da formulação OR-10 não apresentaram diferença estatística em relação àqueles observados para os filmes OR-20, indicando que, para a faixa de concentrações estudadas, o aumento do teor de orégano em pó não afetou significativamente as propriedades mecânicas do material.

Crizel et al. (2018) avaliaram a tensão de ruptura, o módulo de elasticidade e o percentual de elongação para filmes de quitosana com incorporação de farinha de bagaço de azeitona, observando uma redução no valor dessas propriedades se comparados com os filmes produzidos sem a adição da farinha. Os autores atribuíram esse comportamento diretamente à heterogeneidade da estrutura obtida, visto que a farinha se apresentou insolúvel na matriz polimérica. Em outro trabalho, Crizel et al. (2016) também observaram a redução nos valores da tensão de ruptura e do percentual de deformação de filmes poliméricos biodegradáveis devido à incorporação de fibras do bagaço de mirtilo. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho e, da mesma forma, a heterogeneidade da estrutura causada pela incorporação do orégano em pó, observada nas imagens de microscopia óptica, pode ter causado a redução nos valores das propriedades mecânicas dos filmes. Como o pó se mostrou insolúvel, as partículas de orégano dispersas na matriz polimérica podem ter dado origem a pontos de fragilidade e

descontinuidade no material, reduzindo a sua resistência mecânica e sua elasticidade, facilitando a ruptura.

Comparando os resultados para as formulações com óleo e para as formulações com orégano, é possível inferir que a incorporação do particulado, na faixa de concentrações estudada, teve o mesmo efeito nas propriedades mecânicas dos filmes do que a incorporação de óleo essencial de orégano a um teor de 0,5 % ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{solução}}$ ), visto que não há diferença significativa entre os valores medidos para os filmes OR-10, OR-20 e OEO-0,5. Esse resultado sugere que, em termos de resistência mecânica, rigidez e deformação, a adição do pó de orégano se equipara à adição de maiores quantidades de óleo e, nesse caso, seria mais vantajosa economicamente a utilização do orégano em pó, visto que as propriedades mecânicas obtidas são semelhantes.

As propriedades da pele humana variam de acordo com a região do corpo, apresentando um valor máximo de tensão de ruptura de cerca de 30 MPa, módulo de elasticidade com valor de  $83,3 \pm 38,9$  MPa e porcentagem de deformação até a ruptura de  $54 \pm 17$  % (ANNAIDH et al., 2010; EVANS et al., 2013). Todos os filmes obtidos apresentaram valores inferiores ao limite superior da tensão de ruptura para a pele normal, indicando que os filmes apresentam menor resistência mecânica que a pele humana, porém, os resultados obtidos para o MY estão dentro da faixa descrita e os valores de porcentagem de alongação se aproximam do que é relatado na literatura. Tendo em vista esses fatores, pode-se dizer que os filmes obtidos neste trabalho podem ser aplicados como curativo, apresentando propriedades mecânicas, exceto a tensão de ruptura, próximas as da pele, podendo se adaptar às superfícies das feridas, uma característica fundamental para aplicações biomédicas (SCHAEFER et al., 2020). Vale ressaltar que devido a menor resistência, esses filmes podem não ser adequados para locais do corpo onde haja muitas solicitações mecânicas, como joelhos e cotovelos, devido ao risco de ruptura do material.

#### **4.2.8 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e fluxo de vapor de água (FVA)**

Os resultados de PVA e FVA para os filmes obtidos são apresentados na Tabela 6, na qual se observa que os valores foram próximos para todas as formulações, havendo diferença significativa de permeabilidade ao vapor de água

somente para os filmes incorporados com orégano em pó e de fluxo de vapor de água somente para o filme OEO-0,5.

Tabela 6 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e fluxo de vapor de água (FVA) para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo pó de orégano (OR-10 e OR-20), na gramatura de 0,53 g cm<sup>-2</sup>.

<b>Filmes</b>	<b>PVA (g mm h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> kPa<sup>-1</sup>)</b>	<b>FVA (g h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>)</b>
CA	1,06 ± 0,09 <sup>c</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>
OEO-0,25	1,12 ± 0,06 <sup>c</sup>	30 ± 1 <sup>a</sup>
OEO-0,5	1,16 ± 0,07 <sup>c</sup>	27 ± 1 <sup>b</sup>
OR-10	1,43 ± 0,08 <sup>b</sup>	30 ± 1 <sup>a</sup>
OR-20	1,71 ± 0,15 <sup>a</sup>	30 ± 1 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes nas colunas indicam que houve diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Diferentes autores avaliaram as propriedades de barreira ao vapor de água para filmes preparados a partir de quitosana e alginato, na proporção de 1:1, e seus resultados para o FVA variam de 566 a 755 g m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>, ou seja, aproximadamente de 24 a 31 g m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (MENG et al., 2010; PIRES et al., 2018; WANG; KHOR; LIM, 2001). Esses resultados corroboram com o FVA obtido para os filmes CA, que se encontra dentro da faixa descrita na literatura para esses materiais.

Os filmes contendo óleo essencial de orégano não apresentaram diferença significativa para a permeação ao vapor de água com relação aos filmes controle, mesmo com o aumento do teor de óleo. Resultados semelhantes foram descritos por Aguirre, Borneo e Leon (2013), que incorporaram OEO em diferentes proporções (0, 1 e 2 % em massa com relação ao volume total de solução) em filmes de proteína de triticale. Pelissari et al. (2009), para filmes de quitosana e amido de mandioca, também relataram que a incorporação de óleo essencial de orégano em concentrações de 0,1 e 0,5 % (com relação à massa total de solução) não promoveu mudança no valor da PVA, corroborando com o encontrado no presente trabalho.

Por outro lado, o fluxo de vapor de água para os filmes OEO-0,5 foi menor do que o obtido para os filmes CA, possivelmente pelo aumento da hidrofobicidade do

material, corroborando com os resultados para o grau de inchamento dos filmes. Contudo, o comportamento em relação à PVA não sofreu alterações pela adição do OEO, embora fosse esperado que ambas as propriedades tivessem a mesma tendência para o aumento ou redução nos seus valores (HUBNER, 2017).

O óleo essencial de orégano é uma mistura complexa e hidrofóbica, porém, não se pode presumir que a permeação ao vapor de água dos filmes seja reduzida simplesmente pela adição de um componente que diminua a afinidade do material com a água (ATARÉS et al., 2010), tendo em vista que essa é uma propriedade dependente, além da proporção hidrofílica-hidrofóbica dos constituintes (PELLISSARI et al., 2009), da espessura do filme e da diferença de pressão parcial a qual ele é exposto. Como todas as formulações foram submetidas às mesmas condições de umidade relativa e temperatura durante a análise, a diferença de comportamento entre o FVA e a PVA pode ser explicada pela diferença de espessura entre CA e OEO-0,5. A massa de vapor de água que permeou através do filme com maior concentração de óleo foi menor do que para o controle, resultando em um menor fluxo. Porém, a permeabilidade ao vapor de água é diretamente proporcional à espessura e os filmes OEO-0,5 são mais espessos dos que o CA, compensando a menor passagem de vapor e fazendo com que não houvesse mudança significativa para a PVA.

A mesma avaliação pode ser feita para a formulação OEO-0,25, que não demonstrou diferença significativa em relação às amostras controle tanto para a permeação ao vapor de água, quanto para o fluxo de vapor de água. Como a espessura dos filmes OEO-0,25 e CA é a mesma, a PVA e o FVA são afetados somente pela massa de água que permeia em cada filme e os resultados indicam que a quantidade de óleo adicionada a essa formulação não foi suficiente para aumentar a hidrofobicidade do material, também corroborando com os resultados de grau de inchamento.

A adição de orégano em pó promoveu um aumento da permeabilidade ao vapor de água dos filmes, sendo maior seu valor quanto maior a concentração do componente, porém, não houve diferença significativa do fluxo de vapor em relação ao controle para nenhuma das concentrações estudadas. Os maiores valores para PVA podem ser explicados pela maior espessura dos filmes OR-10 e OR-20 quando comparados aos filmes CA, mas também sugerem que a heterogeneidade das estruturas formadas a partir da incorporação do orégano resultou na formação de pontos frágeis, suscetíveis a rupturas e/ou descontinuidades que facilitaram a

passagem de vapor de água, corroborando com as imagens da morfologia ótica, bem como com os resultados para as propriedades mecânicas dos filmes.

O aumento na PVA também foi relatado por Crizel et al. (2016) após a incorporação de fibras do bagaço de mirtilo em formulações de filmes de gelatina, por Luchese et al. (2018) após a adição de pó de bagaço de mirtilo na composição de filmes de amido de mandioca, bem como por Crizel et al. (2018) para filmes de quitosana com farinha de bagaço de azeitona. Da mesma forma, os autores atribuíram esse aumento na PVA à interferência das fibras ou do particulado na matriz filmogênica e à formação de pontos de fragilidade na estrutura que podem permitir a passagem do vapor com maior facilidade.

Para todas as formulações estudadas, os valores para o fluxo de vapor de água classifica os filmes obtidos como oclusivos, categoria na qual o curativo apresenta FVA menor que  $840 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ , ou seja, menor que  $35 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  (BOLTON; MONTE; PIRONE, 2000). O fluxo de vapor de água para a pele normal é de  $8,5 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , mas para uma pele machucada pode variar de 11,6 a  $214,1 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , sendo recomendado um valor entre 83,3 e  $104,2 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para o curativo promover o ambiente úmido adequado para a cicatrização, sem risco de desidratação da ferida (LI et al., 2011; XU et al., 2016; ZAHEDI et al., 2011). O FVA para os filmes apresentados neste estudo é menor do que é recomendado, porém, Wu et al. (1995) relataram que o fluxo de vapor de água para sete curativos comerciais variava entre 5,4 e  $19,8 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , também abaixo da faixa considerada ótima e menores do que os resultados aqui apresentados. Dessa forma, é possível dizer que os filmes CA, bem como OR-10, OR-20, OEO-0,25 e OEO-0,5 possuem propriedades de barreira ao vapor de água melhores do que de alguns curativos sintéticos comerciais e, embora não atinjam o valor ótimo, apresentam PVA dentro da faixa para a pele machucada, portanto, adequados para aplicação como curativos.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DE FATORES ANTIMICROBIANOS DOS FILMES

Nesta seção serão descritos os resultados obtidos qualitativamente para a atividade antimicrobiana atividade de água dos filmes compostos de quitosana e alginato, bem como para os que apresentam orégano ou óleo essencial de orégano em sua composição. Foi avaliado se a ação antimicrobiana dos componentes individuais (quitosana, orégano e OEO) foi mantida nos filmes.

### 4.3.1 Atividade de água ( $A_w$ )

A atividade de água é uma medida da água disponível para reações químicas, bioquímicas e crescimento microbiológico, sendo uma característica física crítica que determina se o produto apresenta a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos (CUNDELL, 2015). Na Tabela 7, estão apresentados os valores de atividade de água dos filmes obtidos, sendo possível observar que todas as formulações apresentaram  $A_w$  bastante próximas, não havendo diferença significativa entre os resultados.

Tabela 7 - Atividade de água ( $A_w$ ) para filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5) e contendo orégano (OR-10 e OR-20).

Filmes	$A_w$
CA	0,45 ± 0,02 <sup>a</sup>
OEO-0,25	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>
OEO-0,5	0,45 ± 0,02 <sup>a</sup>
OR-10	0,44 ± 0,02 <sup>a</sup>
OR-20	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>

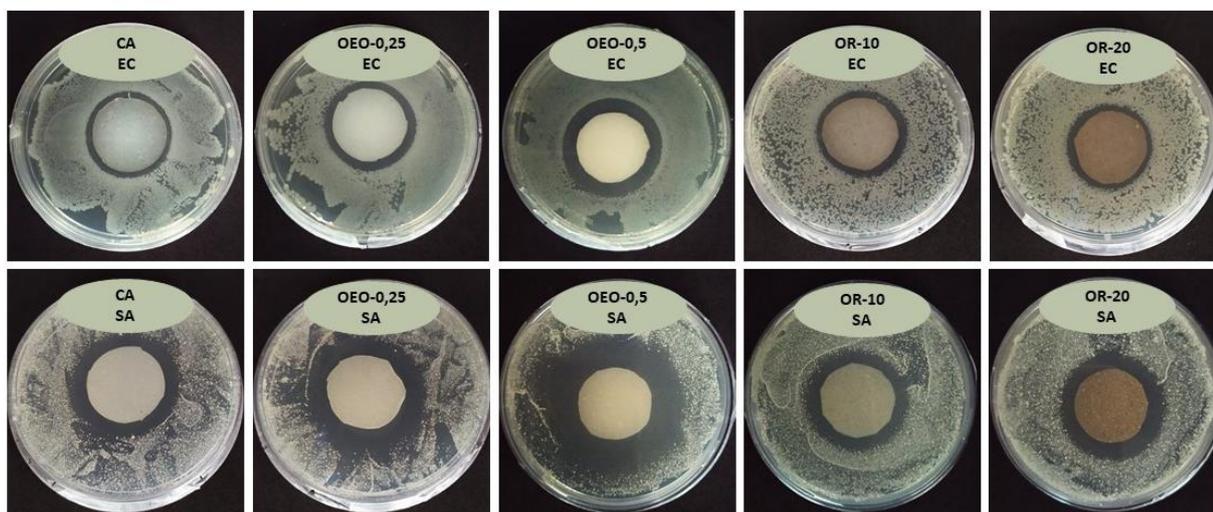
\*Letras diferentes nas colunas indicam que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Para que haja crescimento microbiano, se faz necessário um valor mínimo de 0,61 para a atividade de água, ou seja, abaixo desse valor, os microrganismos não conseguem se proliferar. As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizadas neste trabalho, têm seu crescimento inibido para valores de  $A_w$  menores que 0,80 e 0,95, respectivamente (TAPIA; ALZAMORA; CHIRIFE, 2007). Todos os filmes apresentaram atividade de água abaixo do limite mínimo para o crescimento microbiano, indicando que seu material não proporciona um ambiente adequado à proliferação e, dessa forma, podem ser armazenados sem que haja risco de elevado crescimento de microrganismos. Não foram encontrados na literatura estudos relativos à atividade de água de filmes de quitosana e alginato ou para filmes contendo óleo essencial de orégano e folhas de orégano cominuídas.

### 4.3.2 Inibição do crescimento microbiano

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana, especificamente a antibacteriana, dos filmes compostos de quitosana e alginato, incorporados com orégano estão apresentados na Figura 21 e na Tabela 8. A atividade antibacteriana foi avaliada a partir da inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Figura 21 - Imagem da inibição do crescimento de *Escherichia coli* (EC) e *Staphylococcus aureus* (SA), após 24 h de incubação, para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo orégano (OR-10 e OR-20) e contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5).



A partir das imagens apresentadas na Figura 21 observa-se que para todas as formulações ocorreu a formação de halo de inibição ao redor dos filmes indicando que os filmes apresentaram atividade antibacteriana. A bactéria *Staphylococcus aureus* se mostrou mais susceptível à ação dos componentes com propriedades bioativas (quitosana, orégano e óleo de orégano) do que a *Escherichia coli*, comportamento esperado e que pode ser explicado pela maior resistência das bactérias Gram-negativas, devido à sua membrana externa, em relação às Gram-positivas (GAO et al., 2011).

A atividade antibacteriana dos filmes CA está associada à quitosana, demonstrando que essa propriedade do biopolímero foi mantida no material produzido. Resultado semelhante foi encontrado por Schaefer et al. (2020), que avaliaram ação antimicrobiana de filmes de quitosana e quitosana/amido contra

*Staphylococcus aureus*, e por Maitra e Singh (2018), que também estudaram essa propriedade para filmes de quitosana/amido, porém contra *Escherichia coli*, comprovando a atividade antimicrobiana da quitosana e corroborando com o que é descrito no presente trabalho.

Tabela 8 - Halo de inibição do crescimento de *Escherichia coli* (EC) e *Staphylococcus aureus* (SA), após 24 h de incubação, para os filmes compostos de quitosana e alginato (CA), contendo orégano (OR-10 e OR-20) e contendo óleo essencial de orégano (OEO-0,25 e OEO-0,5).

Filmes	Halo de inibição (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CA	1,9 ± 0,5 <sup>d</sup>	3,4 ± 0,6 <sup>d</sup>
OEO-0,25	3 ± 0,4 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,7 <sup>b</sup>
OEO-0,5	5,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	10 ± 1 <sup>a</sup>
OR-10	2 ± 0,8 <sup>cd</sup>	4 ± 0,7 <sup>d</sup>
OR-20	2,6 ± 0,8 <sup>bc</sup>	5 ± 0,7 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes nas colunas indicam que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A adição de óleo essencial de orégano melhorou a ação antibacteriana dos filmes, observando-se esse efeito pelo aumento da zona de inibição, sendo maior o halo quanto maior a concentração do óleo. Os filmes contendo esse composto apresentaram os melhores resultados para a propriedade, possivelmente devido ao elevado teor de carvacrol e timol do óleo utilizado (aproximadamente 61 %) demonstrando sua efetividade como agente antimicrobiano. O filme OEO-0,5 foi o que apresentou os maiores halos de inibição para ambas as bactérias, resultado esperado por esse filme apresentar a maior quantidade de compostos bioativos dentre todas as formulações estudadas.

Emiroğlu et al. (2010), bem como Hashemi e Khaneghah (2017), avaliaram a influência da adição de óleo essencial de orégano na composição de filmes de soja e de goma da semente do manjeriço, respectivamente, na inibição do crescimento de diversos microrganismos, incluindo as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os autores encontraram resultados semelhantes aos apresentados neste

trabalho, observando que o óleo conferiu atividade antimicrobiana aos filmes, sendo maior essa atividade com o aumento do teor de óleo nas formulações.

Para os filmes com orégano em pó na composição, OR-10 e OR-20, foi possível observar melhora na atividade antibacteriana em relação às amostras controle para ambas as bactérias testadas somente para a formulação com a maior concentração. Esses resultados indicam que as folhas de orégano cominuídas apresentam potencial para aplicação como agente antibacteriano, uma vez que apresenta compostos capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Comparando os filmes obtidos a partir da incorporação de OEO na suspensão filmogênica com os obtidos a partir da adição das folhas de orégano, fica evidente a maior eficiência do óleo como agente antibacteriano, com maiores zonas de inibição. Os compostos bioativos presentes no óleo estão mais disponíveis, isto é, apresentam maior capacidade de difusão através do ágar, enquanto os componentes bioativos presentes nas folhas de orégano possuem o impedimento da parede vegetal das folhas, o que possivelmente dificulta a sua difusão. Além disso, a quantidade de óleo essencial de orégano utilizada nas formulações foi maior do que a de orégano em pó, pois a adição do pó em elevados teores não permite a formação do filme. Tendo em vista que a quantidade de óleo presente no orégano representa uma pequena porcentagem de sua massa (LICATA et al., 2015), o teor de compostos ativos, timol e carvacrol, contidos nos filmes OR-10 e OR-20 é muito menor do que nos filmes OEO-0,25 e OEO-0,5, resultando em menor atividade antibacteriana.

Vale ressaltar que mesmo presente em quantidades inferiores no material quando comparado às formulações com óleo essencial, o orégano em pó foi capaz de melhorar a atividade dos filmes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse resultado demonstra a eficiência do uso das folhas de orégano para a formação de filmes bioativos com capacidade antimicrobiana, sem que haja necessidade de extração do óleo.

## 5 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram desenvolvidos filmes ativos compostos por quitosana e alginato com a adição de folhas de orégano em pó (OR) ou óleo essencial de orégano (OEO), em diferentes concentrações, como agentes antimicrobianos. Para todas as formulações estudadas, houve a formação de filmes macroscopicamente homogêneos, transparentes e fáceis de manusear. Os filmes foram avaliados em relação às propriedades relevantes para a aplicação como curativos e os resultados obtidos estão de acordo com algumas das principais características desejadas nesses produtos (propriedades mecânicas, permeação ao vapor de água, capacidade de absorção de líquidos e atividade antibacteriana).

Em termos da capacidade de barrar a passagem de luz, quando comparados ao controle, os filmes contendo óleo essencial de orégano apresentaram maior transparência na faixa do UV-Vis, proporcionando menor barreira à luz visível, mas demonstraram aumento na proteção contra UV-B. Os filmes provenientes das formulações que continham orégano apresentaram elevadas propriedades de barreira à luz, conferindo proteção contra UV-A e UV-B ao material e, dessa forma, sendo capazes de proteger o ferimento da radiação solar.

A incorporação do OEO e do orégano à estrutura filmogênica ocasionou uma redução das propriedades mecânicas (tensão de ruptura, módulo de Young e alongação) dos filmes em comparação às amostras controle. Para todas as formulações, os filmes apresentaram características mecânicas próximas as da pele humana, exceto a tensão de ruptura, que foi menor do que a da pele, mas dentro da faixa adequada para a aplicação. Além disso, a PVA e o FVA também apresentaram valores adequados para utilização como curativos, sendo a barreira à permeação ao vapor de água elevada com o aumento da concentração de óleo e reduzida com o aumento do teor de orégano em pó.

O grau de inchamento (capacidade de absorção) do material, que reflete a capacidade do curativo em drenar os líquidos da ferida, foi avaliado para água destilada e para solução salina que simula o exsudato. A adição de orégano não afetou a capacidade de absorção dos filmes, em comparação ao controle, porém, a adição de óleo na maior concentração estudada causou uma redução na propriedade. Tanto os filmes contendo OR quanto os contendo OEO em sua composição não tiveram seu grau de inchamento afetado pelo tipo de líquido no qual foram imersos.

A avaliação dos fatores antimicrobianos dos filmes, feita através da análise de atividade de água e formação de halo de inibição, demonstrou que todas as formulações foram capazes de inibir o crescimento de microrganismos, sendo a atividade antibacteriana dos filmes CA atribuída à quitosana, polímero com propriedades antimicrobianas.

A atividade de água dos filmes apresentou valores inferiores ao limite mínimo para proliferação microbiana, característica que permite o armazenamento do material sem risco de elevado crescimento microbiano.

Os resultados obtidos nos ensaios de formação de halo de inibição mostraram que os agentes antimicrobianos utilizados, OEO e OR, melhoraram a atividade dos filmes contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em comparação aos filmes CA. Os filmes contendo óleo essencial de orégano apresentaram o melhor desempenho contra as bactérias, com as maiores zonas de inibição do crescimento, evidenciando a maior eficiência do óleo como agente antibacteriano. Porém, a adição do orégano em pó também foi capaz de aumentar a atividade antibacteriana do material, mesmo com baixas concentrações dos componentes bioativos na estrutura dos filmes, demonstrando seu potencial de utilização sem extração prévia do óleo ou dos compostos responsáveis pela inibição do crescimento dos microrganismos. É importante ressaltar que, além de melhorar a atividade antimicrobiana, a utilização do OEO ou do orégano na obtenção de filmes ativos para curativos pode agregar outras características vantajosas ao material, como atividade anti-inflamatória, também interessante para a aplicação.

A partir da avaliação de todos os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que os filmes com características mais apropriadas para uma possível aplicação como curativo são a OEO-0,5 (quando há necessidade de elevada atividade antimicrobiana) e OR-20 (para uma atividade antimicrobiana moderada).

Por fim, os experimentos realizados no presente estudo demonstraram que os filmes desenvolvidos apresentam potencial para utilização como curativos antibacterianos para tratamentos de feridas, apresentando características oclusivas e drenagem moderada de exsudatos, sendo capazes de manter um ambiente adequado à cicatrização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, S. et al. Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 61, p. 233–240, 2016.

AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEON, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 1, p. 2–9, 2013.

AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 27–37, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2078152015300298>>

AHSAN, S. M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 110, p. 97–109, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>>

AKHTER, R. et al. Functional characterization of biopolymer based composite film: Incorporation of natural essential oils and antimicrobial agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 137, p. 1245–1255, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.214>>

AL-REZA, S. M.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and inhibitory effect of essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. on food-borne pathogens. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 1176–1182, 2009.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.

ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 2227–2236, 2010.

ÁLVAREZ-PAINO, M.; MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M.

Antimicrobial polymers in the nano-world. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 1–44, 2017.

ANITHA, A. et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008>>

ANNAIDH, A. N. et al. Mechanical Properties of Excised Human Skin. **IFMBE Proceedings**, [s. l.], v. 31, p. 1000–1003, 2010. Disponível em: <[www.springerlink.com](http://www.springerlink.com)>

ARDILA, N. et al. Antibacterial activity of neat chitosan powder and flakes. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–19, 2017.

ASTM-E96. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission Materials. **ASTM International**, West Conshohocken, 2016. Disponível em: <[www.astm.org](http://www.astm.org)>

ASTM D882 - 18. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM International**, West Conshohocken, 2018. Disponível em: <[www.astm.org](http://www.astm.org)>

ATARÉS, L. et al. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 384–391, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.004>>

AZIZI, A.; YAN, F.; HONERMEIER, B. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 29, n. 2–3, p. 554–561, 2009.

BAI, M. Y. et al. Foam dressing incorporating herbal extract: An all-natural dressing for potential use in wound healing. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 293–308, 2017.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALDINO, L. et al. Complete glutaraldehyde elimination during chitosan hydrogel

drying by SC-CO<sub>2</sub> processing. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 103, p. 70–76, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.04.020>>

BARBOSA, L. N. et al. Proteomic analysis and antibacterial resistance mechanisms of *Salmonella Enteritidis* submitted to the inhibitory effect of *Origanum vulgare* essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 214, p. 103625, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103625>>

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2008.

BECKER, T. A.; KIPKE, D. R.; BRANDON, T. Calcium alginate gel: A biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 76–86, 2001.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 232–239, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.023>>

BIERHALZ, A. C. K.; WESTIN, C. B.; MORAES, Â. M. Comparison of the properties of membranes produced with alginate and chitosan from mushroom and from shrimp. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 91, p. 496–504, 2016.

BLACK, C. et al. A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 210, p. 551–557, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004>>

BOATENG, J. S. et al. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BOLTON, L. L.; MONTE, K.; PIRONE, L. A. Moisture and healing: beyond the jargon. **Ostomy Wound Management**, [s. l.], v. 46, n. 1 A Suppl, 2000.

BONILLA, J. et al. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 9–16, 2012.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.03.015>>

BUENO, C. Z. et al. Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 44, p. 117–125, 2014.

BUGNICOURT, L.; LADAVIÈRE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 60, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.06.002>>

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

BUSATTA, C. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 610–616, 2007.

CARDONA, A. F.; WILSON, S. E. Skin and Soft-Tissue Infections: A Critical Review and the Role of Telavancin in Their Treatment. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 61, n. Suppl 2, p. S69–S78, 2015.

CARIDADE, S. G. et al. Free-standing polyelectrolyte membranes made of chitosan and alginate. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 1653–1660, 2013.

CASTILLO MARTINEZ, F. A. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013.

CAZÓN, P. et al. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 68, p. 136–148, 2017.

CHANG, K. L. B. et al. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 303, p. 327–332, 1997.

CHANG, Y. et al. **Reduction of *Dickeya chrysanthemi* on fresh-cut iceberg lettuce using antimicrobial sachet containing microencapsulated oregano essential oil.** [s.l.] : Elsevier Ltd, 2017. v. 82 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.043>>

CHEN, H. et al. Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 70, n. Part 2, p. 287–295, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.086>>

CHEN, P. H. et al. Improvement in the properties of chitosan membranes using natural organic acid solutions as solvents for chitosan dissolution. **Journal of Medical and Biological Engineering**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 23–28, 2007.

CHEN, R. H. et al. Changes in the Mark-Houwink hydrodynamic volume of chitosan molecules in solutions of different organic acids, at different temperatures and ionic strengths. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 902–907, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.027>>

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 104, n. 6, p. 1586–1596, 2008.

CHUA, A. W. C. et al. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. **Burns & Trauma**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–14, 2016.

CRIZEL, T. de M. et al. Valorization of food-grade industrial waste in the obtaining active biodegradable films for packaging. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 87, p. 218–228, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.039>>

CRIZEL, T. de M. et al. Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 74, p. 139–150, 2018.

CUNDELL, T. The role of water activity in the microbial stability of non-sterile drug products. **European Pharmaceutical Review**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 58–63, 2015.

D'AYALA, G. G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches. **Molecules**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2069–2106, 2008.

DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; PHILLIPS, T. Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. **Advances in Wound Care**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 32–41, 2016.

DANTAS, M. D. M. et al. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan- based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 51–59, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.06.009>>

DEGREEF, H. J. How to heal a wound fast. **Dermatologic Clinics**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 365–375, 1998.

DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D. K.; TAN, K. Composition and antimicrobial studies of the oils of *origanum calcaratum juss.* and *O. scabrum boiss. et Heldr.* from Greece. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 460–462, 2001.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings – a review. **BioMedicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 24–28, 2015.

DIAS, A. M. A. et al. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 408, n. 1–2, p. 9–19, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.063>>

DOMARD, A.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte Complexes. Interaction of Poly(L-lysine)-Poly(L-glutamic acid) in Dilute Aqueous Solution. **Macromolecules**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 898–904, 1980.

DUTRA, T. V. et al. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 129, n. September 2018, p. 345–349, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.025>>

EMIROĞLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 283–288, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No. 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. n/a. **Official Journal of European Union**, 2009.

EVANS, N. D. et al. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 28, p. 397–409, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.04.023>>

FRAJ, A. et al. A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 140, n. March, p. 111669, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111669>>

GAO, C. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds against selected food-related bacteria. **Food Control**, [s. l.], v. 22, n. 3–4, p. 517–522, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.038>>

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.

GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.012>>

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 3–16, 2009.

GOMEZ, C. G. et al. Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 365–371, 2009.

GRANDE-TOVAR, C. D. et al. Chitosan films incorporated with *Thymus capitatus*

essential oil: mechanical properties and antimicrobial activity against degradative bacterial species isolated from tuna (*Thunnus* sp.) and swordfish (*Xiphias gladius*). **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 4256–4265, 2018.

GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.

HAGHIGHI, H. et al. Comprehensive characterization of active chitosan-gelatin blend films enriched with different essential oils. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 95, n. April, p. 33–42, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.019>>

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. **Biochimie Open**, [s. l.], v. 4, p. 73–77, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2017.02.005>>

HASHEMI, S. M. B.; KHANEGHAH, A. M. Characterization of novel basil-seed gum active edible films and coatings containing oregano essential oil. **Progress in Organic Coatings**, [s. l.], v. 110, n. April, p. 35–41, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.04.041>>

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Polysuccinimide functionalized with oregano's essential oil extracts, an antimicrobial extended release bio-material. **Materials Letters**, [s. l.], v. 191, p. 73–76, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2017.01.035>>

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 273–292, 2005.

HOQUE, J.; HALDAR, J. Direct Synthesis of Dextran-Based Antibacterial Hydrogels for Extended Release of Biocides and Eradication of Topical Biofilms. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 9, n. 19, p. 15975–15985, 2017.

HUBNER, P. **Desenvolvimento de filmes de gelatina contendo zeólita clinoptilolita impregnada com íons prata e avaliação das propriedades antimicrobianas**. 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2017.

HUBNER, P. et al. Gelatin-based films containing clinoptilolite-Ag for application as wound dressing. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 107, n. October 2019, p. 110215, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110215>>

IETSWAART, J. H. **A Taxonomic Revision of the Genus Origanum (Labiatae)**. Amsterdam: Leiden University Press, 1980.

JAYAKUMAR, R.; REIS, R. L.; MANO, J. F. Chemistry and applications of phosphorylated chitin and chitosan. **E-Polymers**, [s. l.], n. 035, p. 1–16, 2006.

JOUKI, M. et al. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 36, p. 9–19, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.030>>

JULIANO, C.; MATTANA, A.; USAI, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of thymus herba-barona loisel growing wild in sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 516–522, 2000.

KARRI, V. V. S. R. et al. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 93, p. 1519–1529, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.038>>

KENNEDY, J. F.; KNILL, C. J.; THORLEY, M. **Natural Polymers for Healing Wounds**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011.

KHAN, M. et al. The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1189–1200, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.02.008>>

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, [s.

l.], v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 119–127, 2008.

KUMAR, M. et al. Thermal degradation kinetics of sugarcane leaves (*Saccharum officinarum* L) using thermo-gravimetric and differential scanning calorimetric studies. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 279, n. November 2018, p. 262–270, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.137>>

LACETA, I. et al. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. **European Polymer Journal journal**, [s. l.], v. 66, p. 170–179, 2015.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>>

LAWRIE, G. et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007.

LEE, M. S. et al. Preparation and Characterization of Small Intestinal Submucosa Coated with Alginate/Gelatin as a Wound Dressing. **Key Engineering Materials**, [s. l.], v. 342–343, p. 69–72, 2007.

LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 6, 2017.

LI, H. et al. Comparison of chitosan / starch composite film properties before and after. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 52, p. 275–279, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.10.016>>

LI, J. et al. Combined effects of octenylsuccination and oregano essential oil on sweet

potato starch films with an emphasis on water resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 115, p. 547–553, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.093>>

LI, X. L. et al. Preparation and Physical Properties of Cavernous Calcium Alginate Wound Dressings. **Advanced Materials Research**, [s. l.], v. 332–334, p. 1670–1675, 2011.

LIAKOS, I. et al. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 463, n. 2, p. 137–145, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.10.046>>

LICATA, M. et al. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian oregano biotypes. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 293–306, 2015.

LIZARDI-MENDOZA, J.; MONAL, W. M. A.; VALENCIA, F. M. G. Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In: **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2016. p. 3–31.

LLOYD, L. L. et al. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 315–322, 1998.

LUCHESE, C. L. et al. Evaluation of blueberry residue incorporated cassava starch film as pH indicator in different simulants and foodstuffs. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 82, p. 209–218, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.010>>

LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Phytochemistry**, [s. l.], v. 119, p. 32–40, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.008>>

LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 64, p. 353–367, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017>>

MA, B. et al. A comparative study on the chitosan membranes prepared from glycine hydrochloride and acetic acid. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 477–482, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.081>>

MA, J. et al. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 331–336, 2001.

MA, L.; YU, W.; MA, X. Preparation and Characterization of Novel Sodium Alginate/Chitosan Two Ply Composite Membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 106, p. 394–399, 2007.

MA, Y. et al. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 81, n. August, p. 522–531, 2017.

MAITRA, J.; SINGH, N. Starch–Chitosan Blend Cross-Linked with Calcium Chloride. In: GUPTA, B. et al. (Eds.). **Advances in Polymer Sciences and Technology**. [s.l.] : Springer Singapore, 2018. p. 133–145.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 59, n. 4–5, p. 207–233, 2007.

MANO, J. F. et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: Present status and some moving trends. **Journal of the Royal Society Interface**, [s. l.], v. 4, n. 17, p. 999–1030, 2007.

MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 228, n. 1–2, p. 111–117, 2001.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 210, p. 402–414, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>>

MARTUCCI, J. F. et al. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, [s.

l.], v. 71, p. 205–213, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.079>>

MASTRO, G. De et al. Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 235, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.019>>

MENG, X. et al. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 1751–1759, 2010.

MERCK. Plate Count Agar. In: **Microbiology Manual**. 12. ed. Darmstadt.

MERDUN, H.; LAOUGÉ, Z. B. Kinetic and thermodynamic analyses during co-pyrolysis of greenhouse wastes and coal by TGA. **Renewable Energy journal**, [s. l.], v. 163, p. 453–464, 2021.

MICHALSKA-SIONKOWSKA, M.; WALCZAK, M.; SIONKOWSKA, A. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. **Polymer Testing**, [s. l.], v. 63, p. 360–366, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.08.036>>

MNDLOVU, H. et al. Development of a fluid-absorptive alginate-chitosan bioplatfrom for potential application as a wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 222, n. January, p. 114988, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.114988>>

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 463, p. 127–136, 2014.

MORALES, A. et al. UV–vis protective poly(vinyl alcohol)/bio-oil innovative films. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 131, n. February, p. 281–292, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.071>>

MURILLO-ÁLVAREZ, J. I.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G. Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially

important seaweeds from Mexico. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 545–548, 2007.

MUXIKA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 105, p. 1358–1368, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>>

NASERI-NOSAR, M.; ZIORA, Z. M. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 189, n. November 2017, p. 379–398, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.003>>

NEGREA, P. et al. The study of infrared spectrum of chitin and chitosan extract as potential sources of biomass. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1129–1138, 2015.

PAGLIONE, I. dos S. et al. Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 22, n. October, p. 100419, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100419>>

PAVONI, J. M. F. **Desenvolvimento de filmes densos de quitosana para aplicações como membranas e embalagens**. 2018. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2018.

PAVONI, J. M. F.; LUCHESE, C. L.; TESSARO, I. C. Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 138, p. 693–703, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.089>>

PEH, K.; KHAN, T.; CH'NG, H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 303–311, 2000.

PELLISSARI, F. M. et al. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava

starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 16, p. 7499–7504, 2009.

PÉREZ-RECALDE, M.; RUIZ ARIAS, I. E.; HERMIDA, É. B. Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 38, n. May 2017, p. 57–65, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.024>>

PIRES, A. L. R. et al. Towards wound dressings with improved properties: Effects of poly(dimethylsiloxane) on chitosan-alginate films loaded with thymol and beta-carotene. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 93, n. November 2017, p. 595–605, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.005>>

PIRES, A. L. R.; MORAES, Â. M. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 132, n. 12, p. 1–9, 2015.

POLA, C. C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 9, p. 69–78, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.07.001>>

QI, Y. et al. Synthesis of Quercetin Loaded Nanoparticles Based on Alginate for Pb(II) Adsorption in Aqueous Solution. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s11671-015-1117-7>>

QIN, C. Q.; DU, Y. M.; XIAO, L. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 211–218, 2002.

QIN, Y. Silver-containing alginate fibres and dressings. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 172–176, 2005.

QIN, Y.; HU, H.; LUO, A. The conversion of calcium alginate fibers into alginic acid fibers and sodium alginate fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 4216–4221, 2006.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, [s. l.], v. 57, p. 397–430, 2008.

RODRIGUES, A. P. et al. The Influence of Preparation Conditions on the Characteristics of Chitosan-Alginate Dressings for Skin Lesions. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 2703–2710, 2008.

SACHAN, N. et al. Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. **Journal of pharmacy research**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 1191–1199, 2009.

SARHEED, O. et al. Antimicrobial Dressings for Improving Wound Healing. In: ALEXANDRESCU, V. A. (Red.). **Wound Healing - New insights into Ancient Challenges**. [s.l.] : IntechOpen, 2016. p. 373–398.

SCHAEFER, E. W. et al. Influence of turmeric incorporation on physicochemical, antimicrobial and mechanical properties of the cornstarch and chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 148, p. 342–350, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.148>>

SEOW, Y. X. et al. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 625–644, 2013.

SHEN, Y. et al. Synthesis and characterization of double-network hydrogels based on sodium alginate and halloysite for slow release fertilizers. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 557–565, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.154>>

SHI, C. et al. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine 1 1 This work was supported by “973” programs on severe trauma (NO. 1999054205 and NO. 2005CB522605) from the Ministry of Science and Technology of China. **Journal of Surgical Research**, [s. l.], v. 133, n. 2, p. 185–192, 2006.

SHILPA, A.; AGRAWAL, S. S.; RAY, A. R. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. **Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews**, [s. l.], v. 43, n. 2,

p. 187–221, 2003.

SHOJAEI, M. et al. Fabrication and characterization of ovalbumin films for wound dressing applications. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 48, p. 158–164, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.063>>

SIDDIQUI, A. R.; BERNSTEIN, J. M. Chronic wound infection: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 519–526, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.009>>

SIEDENBIEDEL, F.; TILLER, J. C. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: Overview and functional principles. **Polymers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 46–71, 2012.

SIMÕES, D. et al. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 127, n. February, p. 130–141, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>>

SOUZA, V. G. L. et al. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 107, n. April, p. 565–572, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056>>

STEVENS, M. M. et al. A rapid-curing alginate gel system : utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, [s. l.], v. 25, p. 887–894, 2004.

STRECKER-MCGRAW, M. K.; JONES, T. R.; BAER, D. G. Soft Tissue Wounds and Principles of Healing. **Emergency Medicine Clinics of North America**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1–22, 2007.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1285–1309, 2013.

SUNDARAMURTHI, D.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Electrospun nanofibers as scaffolds for skin tissue engineering. **Polymer Reviews**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 348–376, 2014.

SVOBODA, K.; BROOKER, J. D.; ZRUSTOVA, J. Antibacterial and antioxidant properties of essential oils: Their potential applications in the food industries. **Acta**

**Horticulturae**, [s. l.], v. 709, p. 35–43, 2006.

SZEKALSKA, M. et al. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. **International Journal of Polymer Science**, [s. l.], v. 2016, p. 1–17, 2016.

TAPIA, M. S.; ALZAMORA, S. M.; CHIRIFE, J. Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability: As a Hurdle in Food Preservation. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. (Eds.). **Water Activity in Foods**. [s.l.] : Blackwell Publishing, 2007.

TEIXEIRA-COSTA, B. E. et al. Encapsulation and antioxidant activity of assai pulp oil (Euterpe oleracea) in chitosan/alginate polyelectrolyte complexes. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 109, p. 106097, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106097>>

TEMPLER, S. J.; BRITO, M. O. Bacterial skin and soft tissue infections. **Hospital Physician**, [s. l.], v. 26, p. 9–26, 2009.

THU, H. E.; ZULFAKAR, M. H.; NG, S. F. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 434, n. 1–2, p. 375–383, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.044>>

TIWARI, B. K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 2009.

TORRES, F. G.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. P. Starch-based biomaterials for wound-dressing applications. **Starch/Staerke**, [s. l.], v. 65, n. 7–8, p. 543–551, 2013.

TSUCHIDA, E.; ABE, K. Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes. In: **Advances in Polymer Science**. Berlin: Springer-Verla, 1982. p. 1–125.

TUMMALAPALLI, M. et al. Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 82, p. 104–113, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.087>>

VALDERRAMA, A. C. S.; ROJAS DE, G. C. Traceability of Active Compounds of Essential Oils in Antimicrobial Food Packaging Using a Chemometric Method by ATR-FTIR. **American Journal of Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 08, n. 11, p. 726–741, 2017.

VAN DEN BROEK, L. A. M. et al. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 116, p. 237–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.039>>

VARAPRASAD, K. et al. Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 236, p. 116025, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116025>>

VELÁSQUEZ-COCK, J. et al. Influence of the acid type in the production of chitosan films reinforced with bacterial nanocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 69, p. 208–213, 2014.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. **Surgery (United Kingdom)**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 489–494, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>>

VUNAIN, E.; MISHRA, A. K.; MAMBA, B. B. Fundamentals of chitosan for biomedical applications. In: **Chitosan Based Biomaterials**. [s.l.] : Elsevier, 2016. v. 1p. 3–30.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Chitosan-alginate-CaCl<sub>2</sub> system for membrane coat application. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 8, p. 1134–1142, 2001.

WEBSTER, L.; HUGLIN, M. B.; ROBB, I. D. Complex formation between polyelectrolytes in dilute aqueous solution. **Polymer**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 1373–1380, 1997.

WIEGAND, C.; HEINZE, T.; HIPLER, U. C. Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. **Wound Repair and Regeneration**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 511–521, 2009.

WIEGAND, C.; HIPLER, U. C. Polymer-based biomaterials as dressings for chronic stagnating wounds. **Macromolecular Symposia**, [s. l.], v. 294, n. 2, p. 1–13, 2010.

WU, P. et al. In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings. **Biomaterials**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 171–175, 1995.

XIE, H. et al. Preparation of chitosan-collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, n. PartA, p. 93–104, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.142>>

XU, R. et al. Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. November 2015, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep24596>>

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZAHEDI, P. et al. Preparation and Performance Evaluation of Tetracycline Hydrochloride Loaded Wound Dressing Mats Based on Electrospun Nanofibrous Poly(lactic acid)/Poly(?-caprolactone) Blends. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 124, p. 4174–4183, 2011.

ZHOU, Y. et al. Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 112, p. 7–13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.102>>

## APÊNDICE A

Neste apêndice está descrita a metodologia utilizada para avaliar a massa específica do óleo essencial de orégano utilizado na obtenção dos filmes OEO-1, OEO-0,5 e OEO-0,25.

A análise foi feita a partir de uma adaptação da técnica de picnometria. Balões volumétricos (10 mL), previamente pesados em balança analítica (ATY224, Shimadzu, Japão), foram preenchidos com água destilada em temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C) e pesados novamente. A diferença entre a massa do balão preenchido e do balão vazio determina a massa de água contida no recipiente e, conhecendo a massa específica desse líquido na temperatura em que foram feitas as medidas, o volume dos balões foi aferido de acordo com a Equação A1.

$$V_{bal\tilde{a}o} = \frac{m}{\rho} \quad (A1)$$

onde  $m$  é a massa de líquido e  $\rho$  é a massa específica desse mesmo líquido.

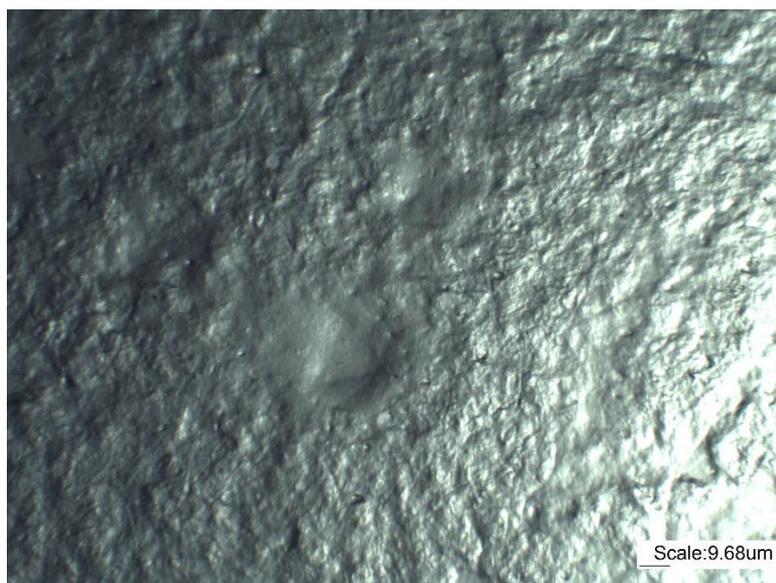
Na sequência, com os recipientes já secos, os balões volumétricos foram preenchidos com o óleo essencial de orégano e novamente pesados e, da mesma forma que para a água, a massa de óleo foi determinada. Utilizando o volume aferido dos balões, a massa específica do OEO pôde ser, então, determinada. Esse procedimento foi realizado em triplicata, resultando no valor de 0,9447 g mL<sup>-1</sup>.

## APÊNDICE B

Neste apêndice estão apresentados os resultados das análises de caracterização feitas para os filmes OEO-1, realizadas em duplicata, sendo elas: microscopia óptica, espessura, grau de inchamento (GI), propriedades mecânicas, permeação e fluxo de vapor de água e FTIR.

Nas imagens obtidas por microscopia óptica das amostras, Figura B1, é possível observar a morfologia do material. A superfície do filme se mostrou contínua e majoritariamente homogênea, com pequenas irregularidades provenientes da dispersão do óleo essencial de orégano na estrutura filmogênica, em concordância com as observações feitas para as outras formulações que continham o OEO.

Figura B1 - Morfologia dos filmes OEO-1; microscopia óptica, modo transmitância com magnificação de 5x.



Os resultados obtidos para espessura, grau de inchamento, permeabilidade e fluxo de vapor de água estão apresentados na Tabela B1. Os valores de grau de inchamento (em água destilada e em solução salina que simula a parte inorgânica do exsudato de feridas) e FVA são baixos quando comparados com o obtido para as outras formulações, possivelmente pelo aumento na hidrofobicidade dos filmes devido ao aumento da concentração de óleo na formulação.

Tabela B1 - Espessura, grau de inchamento (GI) e propriedades de barreira ao vapor de água (PVA e FVA) dos filmes OEO-1.

<b>Propriedade</b>	<b>OEO-1</b>
Espessura ( $\mu\text{m}$ )	$104 \pm 7$
$\text{GI}_{\text{água}}$ (%)	$50 \pm 9$
$\text{GI}_{\text{solução salina}}$ (%)	$48 \pm 7$
PVA ( $\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ KPa}^{-1}$ )	$1,15 \pm 0,29$
FVA ( $\text{g h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ )	$19,8 \pm 3,42$

As propriedades mecânicas dos filmes, Tabela B2, seguiram o mesmo comportamento descrito para as outras formulações com óleo. Os filmes OEO-1 apresentaram, dentre todas as formulações estudadas, os menores valores de tensão de ruptura e módulo de Young, indicando menor resistência mecânica e rigidez inferior em comparação com as demais estruturas filmogênicas obtidas.

Tabela B2 - Propriedades mecânicas dos filmes OEO-1.

<b>Propriedade</b>	<b>OEO-1</b>
Tensão de Ruptura (MPa)	$5,3 \pm 0,6$
Módulo de Young (MPa)	$46 \pm 8$
Elongação (%)	$36 \pm 3$

Na Figura B2 está representado o espectro de FTIR dos filmes. É possível observar que as bandas características da quitosana e do alginato estão presentes e a intensificação dos picos nas regiões características tanto dos biopolímeros quanto do óleo essencial de orégano é um indicativo da sua incorporação na estrutura filmogênica, da mesma forma que se observou para as demais formulações que continham OEO em sua composição.

Figura B2 - Espectro de FTIR dos filmes OEO-1.

