

## RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.) PARA A ELABORAÇÃO DE MEMBRANAS COMO POTENCIAL CURATIVO CUTÂNEO

PAULINO, L. G. S.<sup>1</sup>; ALVES, R. C.<sup>2</sup>; MORAES, C. C.<sup>3</sup>; ROSA, G. S.<sup>4</sup>

<sup>1, 2, 3, 4</sup>Universidade Federal do Pampa.

### RESUMO

Os subprodutos gerados pela indústria do azeite representam cerca de 10% do peso total da produção. As folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) são tratadas como resíduo na indústria oleícola, entretanto, é um dos subprodutos de maior valor da indústria por representar uma ótima fonte de recuperação de compostos bioativos, como antioxidantes, antimicrobianos e anti-inflamatórios. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi extrair os compostos bioativos de resíduos da olivicultura e aplicá-los em membranas de quitosana para a potencial aplicação como curativos cutâneos. Os extratos utilizando o pó da folha de oliveira foram obtidos através do banho metabólico *Dubnoff* nas condições de 2 h à 88 °C. As membranas de quitosana foram obtidas com diferentes concentrações de extrato (25 e 50 %) e caracterizadas com relação à sua morfologia (MEV), intumescimento e capacidade de drenagem de fluidos (CDF). As membranas com 25 % de extrato apresentaram a maior homogeneidade e sem a presença de aglomerados em sua estrutura quando analisadas no MEV, obtiveram-se também  $138,59 \pm 7,92\%$  de intumescimento,  $40,41 \pm 3,30 \text{ g.m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  de CDF. As membranas biodegradáveis incorporadas com o extrato de folhas de oliveira apresentaram-se promissoras para aplicação como curativos cutâneos, uma vez que foram capazes de promover propriedades essenciais para a etapa de cicatrização.

**Palavras-chave:** Extrato; Biopolímero; Quitosana.

### INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta arbórea da família botânica *Oleaceae* originária da região extensa do Mediterrâneo, cujo o seu cultivo foi difundido para diversos países que apresentavam um clima análogo ao de origem. O cultivo da oliveira no Brasil foi introduzido no século XIX se concentrando na região sul do país. Do ponto de vista industrial, a olivicultura tem representado uma fonte econômica e social altamente relevante em decorrência da extração do azeite e a produção de azeitonas (RODRIGUES *et al.*, 2015). Contudo, durante o processamento do azeite é produzido uma alta quantidade de resíduos e subprodutos, como por exemplo as folhas que podem representar entre 5% e 10% de subproduto gerado nas etapas de processamento da azeitona (NUNES *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Diante do aumento da demanda pela valorização de resíduos e subprodutos do processo de produção de azeite, o extrato de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) é um dos subprodutos de maior valor provenientes da indústria do azeite. Sendo o extrato vegetal com potencial para a aplicação em filmes biodegradáveis devido à alta porcentagem de compostos ativos

pertencentes a secoiridóides, hidroxitirosol, polifenóis, triterpenos e flavonóides. A oleuropeína, em particular, é um secoiridóide, encontrado na casca da azeitona, sementes, óleo e principalmente nas folhas (DUA *et al.*, 2015). Este composto é responsável pelas propriedades do extrato de folha de oliveira, como atividade antioxidante e antimicrobiana (AHMED *et al.*, 2014).

Atualmente, produtos de origem natural têm sido largamente utilizados no tratamento de feridas cutâneas. Dessa forma, pesquisas têm mostrado promissor o uso de biopolímero para o desenvolvimento de novos materiais destinados a aplicações biomédicas. Os polissacarídeos têm sido amplamente utilizados com sucesso para a obtenção membranas, destacando-se a quitosana devido à sua disponibilidade e biodegradabilidade, além de ser um excelente material para a confecção de membranas por apresenta inúmeras características, como não-toxicidade, biocompatibilidade, efeito hemostático, atividade anticoagulante, antifúngica, antiviral e antibacteriana, que são propriedade capazes de desempenhar funções que favorecem uma resposta biológica mais rápida e eficaz no processo de cicatrização da feridas (MOURO *et al.*, 2020; ZAHID *et al.*, 2021).

Neste contexto, as membranas à base de biopolímeros têm sido uma alternativa eficiente no tratamento de lesões cutâneas devido à capacidade de estimular o sistema imune e contribuir para a etapa de cicatrização. Dessa forma, buscando a melhorar a atuação destas membranas, a incorporação de extrato de folhas de oliveira na matriz sólida da membrana se mostrou uma alternativa promissora devido às propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias e anestésica deste material. Logo, o objetivo deste trabalho foi aproveitar os resíduos da olivicultura como fonte de compostos bioativos e incorporar o extrato em membranas de quitosana para futura aplicação como curativo cutâneo.

## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) foram cedidas pela Estância Guarda Velha, no município de Pinheiro Machado, Rio Grande do Sul. Após a coleta, as folhas *in natura* foram higienizadas com água corrente, solução comercial de hipoclorito de sódio 2 % a 2,5 % e água destilada esterilizada. Em seguida, foram secas em estufas à temperatura de 40 °C por um período de 24h e moídas em moinho analítico (IKA® – A11BS32, China). E por fim, foi realizada a padronização granulométrica das folhas de oliveira por meio do peneiramento em peneira de 60 *mesh* (MARTINY, 2021).

Os extratos das folhas de oliveira (EFO) foram obtidos pelo processo de maceração dinâmica. Foram pesadas 1 g do pó de folhas de oliveiras secas e adicionados 50 mL de água destilada em *erlenmeyers*. A extração ocorreu através do banho metabólico *Dubnoff* (QUIMIS, Brasil) por um período de 2 h em uma temperatura de 88 °C. Em seguida, os extratos obtidos passaram por uma filtração simples utilizando filtros de malha de *nylon* (Nytex) (MARTINY, 2021).

As membranas de quitosana pura (MP) foram produzidas através da técnica de *casting*. As soluções filmogênicas foram preparadas a partir da adição de 1% (m/v) de quitosana em solução de ácido acético 1 % (v/v), no qual foram submetidas a agitação constante por 24 h a temperatura  $\pm 25$  °C. Nos 15 min finais do tempo de agitação foram adicionados 20% de glicerol. As soluções obtidas foram vertidas em placas de acrílico e levadas à estufa a 40 °C, por 24 h, de forma a evaporar o solvente. Após evaporação do solvente, as membranas obtidas foram armazenadas em dessecadores com umidade relativa controlada de 50 % por no mínimo 48 h, antes de serem removidas das placas e submetidas a análises. As membranas de quitosana com extrato de folhas de oliveira (ME) foram preparadas através da adição de diferentes volumes de extrato de folhas de oliveira, 25% (ME<sub>25,0</sub> %) e 50% (ME<sub>50,0</sub> %), em relação ao volume da solução de quitosana.

Primeiramente, as membranas passaram por uma análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (CARL ZEISS - EVO MA10, Estados Unidos), utilizando uma voltagem de aceleração de 20 kV com uma magnificação de 1000 vezes.

Para a realização do ensaio de intumescimento (I), as membranas foram cortadas no formato de quadrado, 2,5 x 2,5 cm, e submetidas a uma pesagem, em seguida, imergindo em água miliQ (25°C) por 2 min. Após este período, as amostras úmidas foram secas com papel toalha para absorção da umidade excessiva e pesadas novamente. Estas análises foram realizadas em triplicatas para cada composição, tomando como resultados suas médias. A quantidade de água absorvida foi calculada por meio da Equação 1:

$$I = \frac{m_f - m_i}{m_i} \quad (1)$$

onde I é o intumescimento em %,  $m_i$  é a massa da membrana antes da imersão em água e  $m_f$  a massa da membrana após a remoção do excesso de água.

E por fim foram realizadas as análises de capacidade de drenagem de fluidos (CDF), onde preparou-se uma solução contendo 142 mmol. L<sup>-1</sup> de íons sódio e 2,5 mmol. L<sup>-1</sup> de íons cálcio, sendo identificada como fluido de exsudato simulado (FES). As membranas foram acondicionadas por 48 h em umidade relativa de 50% e cortados em discos de 2,7 cm de diâmetro, pesados, aplicados nas bordas de copos de Paddington modificados contendo 20 mL de FES e fixadas com anel de vedação, em seguida, pesados novamente. Os copos contendo as membranas foram invertidos de modo que as amostras ficassem em contato com o FES e mantidos a 37 °C por 24 h em um dessecador contendo sílica gel. Ao fim deste período, o sistema foi mantido à temperatura ambiente por 30 min e foram realizadas a pesagem dos corpos novamente. A capacidade de drenagem de fluidos (CDF) foi determinada empregando-se a Equação 2:

$$CDF = \frac{m_{is} - m_{fs}}{t \cdot A} + \frac{m_{im} - m_{fm}}{t \cdot A} \quad (2)$$

onde  $m_{is}$  é a massa inicial do sistema,  $m_{fs}$  é a massa final do sistema após o período de drenagem,  $m_{im}$  é a massa inicial da membrana,  $m_{fm}$  é a massa final da membrana após período de drenagem, A é a área de contato entre a membrana e o fluido e t é o tempo decorrido.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micrografias obtidas na análise MEV para as amostras de quitosana pura (A) e membranas de quitosana com extrato de folhas de oliveira (B e C) são observadas na Figura 1. Ressalta-se que houve diferença entre as amostras, pois a amostra A apresentou uma superfície lisa e homogênea, com a presença de aglomerados pontuais em sua matriz, resultado semelhante foi encontrado por Guimarães (2018). Por outro lado, quando adicionado o EFO na estrutura das membranas foi possível observar uma uniformidade e a ausência de aglomerados, observados nas amostras B e C. Em contrapartida, com o aumento quantitativo de extratos na membrana foi observado o surgimento de bolhas em sua estrutura, observado na amostra C.

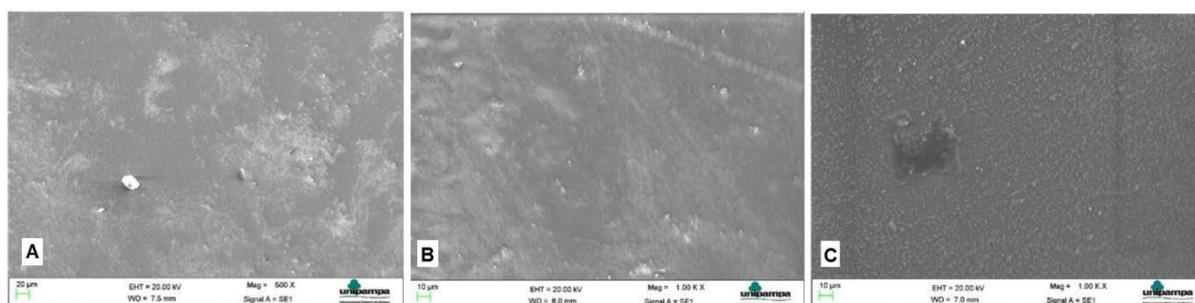


Figura 1. Micrografias obtidas por MEV das membranas: (A) MP, (B) ME<sub>25%</sub>, (C) ME<sub>50%</sub>.

Corroborando este estudo, pesquisadores como Kamel *et al.* (2020), Ferreira *et al.* (2022), Deobonea *et al.* (2019) apontaram que o aumento na concentração dos extratos proporcionou uma distribuição irregular na estrutura das membranas de quitosana. Enquanto, Anjos (2017) também verificou que o aumento da porcentagem de extrato adicionada às composições resultou na formação de uma matriz mais densa e com formação de bolhas, que propiciou uma alteração na superfície das membranas. Além disso, Sousa (2017) também relatou que a provável causa da irregularidade na estrutura seria em decorrência da deposição de compostos orgânicos dos extratos na superfície da membrana ou pela formação de bolhas atribuídas à etapa de evaporação de solvente.

Os valores obtidos nas análises de intumescimento das membranas foram de  $357,64 \pm 17,68$ ,  $138,59 \pm 7,92$ ,  $86,61 \pm 5,19$  % para MP, ME<sub>25%</sub>, e ME<sub>50%</sub>, respectivamente. Em relação às membranas de quitosana com EFO, observou-se que houve diferença no percentual de intumescimento das amostras com o aumento do EFO na matriz polimérica. Este comportamento foi observado por Santos (2018), onde verificou em seu trabalho que quanto maior a concentração de compostos bioativos adicionados na membrana, menor foi o poder de intumescimento exibido por elas.

O intumescimento de um material é considerado como fator determinante para uma eficaz difusão de nutrientes e células. No processo de cicatrização, materiais com elevado grau de intumescimento tendem a favorecer processo devido à sua maior capacidade de absorção de exsudados (LEITE; WANDERLEY; SALVIANO, 2021). Dessa forma, segundo os autores Alminderej (2019) e Morgado *et al.* (2017) a capacidade de intumescimento está diretamente

relacionada com a capacidade de absorção dos curativos. Mostrando assim, que os resultados mais promissores para tratamento de lesões seriam das MP e das ME<sub>25%</sub>.

A taxa de drenagem de soluções é um fator importante para o desenvolvimento de curativos, pois estes devem ser os parâmetros capazes de impedir o acúmulo de exsudatos e a desidratação excessiva da lesão. Dessa forma, os valores obtidos nos ensaios de drenagem foram de  $22,75 \pm 4,80$ ,  $40,41 \pm 3,30$ ,  $29,31 \pm 1,65$  g.m<sup>-2</sup> .h<sup>-1</sup> para MP, ME<sub>25%</sub>, ME<sub>50%</sub>, respectivamente. Diante dos resultados expostos pode-se observar que houve uma melhora nas taxas de drenagem das membranas aditivadas com EFO em relação à MP, mais pronunciado para as membranas aditivadas com 25% de EFO. Esta melhora ocorreu devido à possível adesão do composto na matriz polimérica, onde ocasionou uma maior permeação de água.

Além disso, é possível observar que ocorreu uma diminuição da CDF com o aumento na concentração do EFO nas membranas. Este comportamento também foi observado nos resultados de intumescimento, podendo estar relacionada às mudanças físico-químicas das propriedades das membranas quando aditivadas. Girata (2011) observou que a capacidade de drenagem das membranas de quitosana e alginato quando aditivadas com AlphaSan® reduziu com o aumento da concentração do composto, que dificultou a drenagem de fluidos.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que a composição que indicou melhores resultados diante dos testes realizados, tornando a mais promissora para a aplicação como curativo, foi a membrana com adição de 25% de EFO, apresentando morfologicamente maior homogeneidade e menores irregularidades em sua estrutura, além de ótimas propriedades de intumescimento e uma drenagem de fluidos. Para tanto, são necessários mais estudos e realização de testes biológicos para avaliar sua eficácia na proteção como curativo, pretende-se, também em trabalhos futuros, que mais pesquisas sejam realizadas visando investigar o poder antioxidante e antimicrobiano do extrato.

Agradecimento: A Universidade Federal do Pampa, ao Grupo de Pesquisa Engenharia de Processos em Sistemas Particulados (GPEPSP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) por proporcionar a exposição deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, A. M. et al. Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 53–56, 2014.
- ALMINDEREJ, F. M., Study of new cellulosic dressing with enhanced antibacterial performance grafted with a biopolymer of chitosan and myrrh polysaccharide extract, **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 2, pp. 3672-3681, 2019.
- ANJOS, F. F. dos. Preparo e caracterização de membranas de quitosana com incorporação do extrato hidroalcoólico liofilizado do *Chenopodium ambrosioides* para aplicação como biomaterial. **Tese** apresentada ao Instituto Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais– Área de Concentração: Caracterização e processamento de materiais. Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo. Coorientador: Prof. Dr. Haroldo Reis Alves de Macêdo. Teresina- PI. 2017.
- DEBONE, H. S. et al. Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 146–152, 2019.
- DUA, S.; BHAT, Z. F.; KUMAR, S. Effect of oleuropein on the oxidative stability and storage quality of Tabaq-Maz, fried mutton ribs. **Food Bioscience**, v. 12, p. 84–92, 2015.
- FERREIRA, E. DA S. et al. Synthesis and Characterization of Natural Polymeric Membranes Composed of Chitosan, Green Banana Peel Extract and Andiroba Oil. **Polymers**, v. 14, n. 6, p. 1105, 10, 2022.
- GIRATA, A. K. Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata. **Tese** apresentada à Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química – Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos. Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ângela Maria Moraes. Campinas- SP. 2011.
- GUIMARÃES, A. A. S. Hidrogéis à base de quitosana/poli(álcool vinílico) para liberação de fármaco visando uso potencial como curativo. **Tese** apresentada à Universidade Federal da Paraíba para obtenção do título de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais. Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Itamara Ferreira Leite. João Pessoa- PB. 2018.
- KAMEL, N. A.; ABD EL-MESSIEH, S. L.; SALEH, N. M. Chitosan/banana peel powder nanocomposites for wound dressing application: Preparation and characterization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 543–550, 2017.
- LEITE, I.F; WANDERLEY, W.F; SALVIANO, A.T.M. Membranas naturais de quitosana bioativas para uso potencial como curativos. **Em Engenharia de Materiais e Metalúrgica**; Oliveira, AC, Holzmann, HA, Dallamuta, J., Eds.; Atenas: Ponta Grossa, Brasil, 2021; Volume 2, pp. 174-185.

MARTINY, T. R. et al. Optimization of green extraction for the recovery of bioactive compounds from Brazilian olive crops and evaluation of its potential as a natural preservative. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 105130, abr. 2021

MORGADO, P. I. et al. Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly efficient strategy towards an improved skin wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 136-145, 2017.

MOURO, C.; FANGUEIRO, R.; GOUVEIA, I. C. Preparation and Characterization of Electrospun Double-layered Nanocomposites Membranes as a Carrier for *Centella asiatica* (L.). **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2653, 2020

RODRIGUES, F.; PIMENTEL, F. B.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p.116–124, 2015.

NUNES, M. A. et al. Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 35, p. 139–148, 2016.

SANTOS, E. P. dos. Membranas de quitosana/bioativos naturais com atividade antimicrobiana para tratamento de lesões cutâneas. **Tese** apresentada à Universidade Federal da Paraíba para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais – Área de Concentração: Desenvolvimento e propriedades de materiais. Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Itamara Ferreira Leite. João Pessoa- PB. 2018.

SOUSA, F.M.S. de. Preparo e caracterização de membranas de quitosana com extratos foliares de *Combretum duarceanum cambess* para aplicações biológicas. **Tese** apresentada ao Instituto Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais– Área de Concentração: Caracterização e processamento de materiais. Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina de Oliveira Cardoso Macêdo. Coorientador: Prof. Dr. Haroldo Reis Alves de Macêdo. Teresina-PI. 2017.

ZAHID, M. et al. Sustainable Development of Chitosan/Calotropis procera-Based Hydrogels to Stimulate Formation of Granulation Tissue and Angiogenesis in Wound Healing Applications. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3284, 2021.