

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS
RAFAEL CARVALHO ALVES

MEMBRANAS CURATIVAS COM PRINCÍPIO ATIVO DE FOLHAS DE OLIVEIRA
E POTENCIAL PARA APLICAÇÕES TÓPICAS

Bagé
2022

RAFAEL CARVALHO ALVES

**MEMBRANAS CURATIVAS COM PRINCÍPIO ATIVO DE FOLHAS DE OLIVEIRA
E POTENCIAL PARA APLICAÇÕES TÓPICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gabriela Silveira da Rosa

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Caroline Costa Moraes

**Bagé
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

A474mm Alves, Rafael Carvalho

Membranas curativas com princípio ativo de folhas de
oliveira e potencial para aplicações tópicas / Rafael Carvalho
Alves.

63 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS, 2022.

“Orientação: Gabriela Silveira da Rosa”

1. Quitosana. 2. Extrato de folhas de oliveira. 3.
Curativos para feridas. I. Título.

RAFAEL CARVALHO ALVES

**MEMBRANAS CURATIVAS COM PRINCÍPIO ATIVO DE FOLHAS DE OLIVEIRA
E POTENCIAL PARA APLICAÇÕES TÓPICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 29 de junho de 2022.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Gabriela Silveira da Rosa
Orientadora
(Unipampa)

Prof.^a Dr.^a Caroline Costa Moraes
Coorientadora
(Unipampa)

Prof.^a Dr.^a Catarina Costa de Moura
(Unipampa)

Prof.^a Dr.^a Thamiris Renata Martiny
(Unipampa)



Assinado eletronicamente por **GABRIELA SILVEIRA DA ROSA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/07/2022, às 08:30, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CAROLINE COSTA MORAES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/07/2022, às 08:33, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CATARINA MOTTA DE MOURA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/07/2022, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Thamiris Renata Martiny, Usuário Externo**, em 04/07/2022, às 20:21, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0837257** e o código CRC **2B328CEC**.

RESUMO

Este trabalho visou a obtenção de membranas biopoliméricas a partir de materiais de origem natural, por processos ambientalmente amigáveis, para aplicação como curativos de uso tópico no tratamento de feridas. Foram utilizados quitosana (polímero de origem natural) como matriz, extratos naturais de folhas de oliveira como aditivos e glicerol como plastificante. Assim, foram preparadas membranas de quitosana pura e aditivadas com extratos de folhas de oliveira, utilizando-se a metodologia de *casting*. As membranas foram caracterizadas quanto a suas propriedades morfológicas (MEV), físicas (espessura), mecânicas (tensão de ruptura e alongamento), de barreira (TVA e PVA), de absorção de fluidos (solubilidade e intumescimento) e de inibição e barreira contra micro-organismos patogênicos. Os resultados para as membranas de quitosana pura e aditivadas com extrato, respectivamente, foram: espessuras de $0,032 \pm 0,009$ mm e $0,040 \pm 0,017$ mm, tensão na ruptura de $5,77 \pm 1,35$ MPa e $3,11 \pm 0,71$ MPa, alongamento na ruptura de $30,89 \pm 4,30$ % e $31,53 \pm 1,67$ %, TVA de $510,39 \pm 12,10$ g.m⁻².dia⁻¹ e $581,84 \pm 6,03$ g.m⁻².dia⁻¹, PVA de $6,23 \pm 0,97$ g.mm.kPa⁻¹.dia⁻¹.m⁻² e $5,52 \pm 1,10$ g.mm.kPa⁻¹.dia⁻¹.m⁻², intumescimento de $242,60 \pm 12,41$ % e $59,45 \pm 3,60$ %, solubilidade de $18,57 \pm 1,64$ % e $31,55 \pm 5,79$ %. Os resultados de inibição à micro-organismo mostraram que a composição de quitosana pura não apresentou nenhuma efetividade, enquanto a composição aditivada com extrato de folhas de oliveira apresentou boa inibição contra o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Ambas as composições apresentaram boas propriedades de barreira nos ensaios de permeação microbiana. Os resultados encontrados para estas propriedades indicaram que, em geral, as membranas apresentaram propriedades que possibilitam sua aplicação tópica no tratamento de feridas, provendo proteção física contra desgaste mecânico, mantendo um ambiente favorável à cicatrização, inibindo infecções por micro-organismos e estimulando a sua recuperação, tendo as membranas aditivas com extrato de folhas de oliveira se destacado principalmente na inibição a micro-organismos.

Palavras-chave: Quitosana. Extrato de folhas de oliveira. Curativos para feridas.

ABSTRACT

This work aimed to obtain biopolymeric membranes from materials of natural origin, by environmentally friendly processes, for application as topical dressings in wound treatment. Chitosan (polymer of natural origin) was used as matrix, natural extracts of olive leaves as additives and glycerol as plasticizer. Thus, pure chitosan membranes were prepared and added with olive leaf extracts, using the casting methodology. The membranes were characterized in terms of their morphological (SEM), physical (thickness), mechanical (tensile strength and elongation), barrier (TVW and WVP), fluid absorption (solubility and swelling) and inhibition and barrier properties against pathogenic microorganisms. The results for the pure and additive chitosan membranes with extract, respectively, were: thicknesses of 0.032 ± 0.009 mm and 0.040 ± 0.017 mm, tensile strength of 5.77 ± 1.35 MPa and 3.11 ± 0.71 MPa, elongation at break of $30.89 \pm 4.30\%$ and $31.53 \pm 1.67\%$, TVA of 510.39 ± 12.10 g.m⁻².day⁻¹ and 581.84 ± 6.03 g.m⁻².day⁻¹, WVP of 6.23 ± 0.97 g.mm.kPa⁻¹.day⁻¹.m⁻² and 5.52 ± 1.10 g.mm.kPa⁻¹.day⁻¹.m⁻², swelling of 242.60 ± 12.41 % and 59.45 ± 3.60 %, solubility of 18.57 ± 1.64 % and 31.55 ± 5.79 %. The results of inhibition to the microorganism showed that the composition of pure chitosan did not present any effectiveness, while the composition added with extract of olive leaves showed good inhibition against the growth of *E. coli* and *S. aureus*. Both compositions showed good barrier properties in microbial permeation tests. The results found for these properties indicated that, in general, the membranes presented properties that allow their topical application in the treatment of wounds, providing physical protection against mechanical wear, maintaining a favorable environment for healing, inhibiting infections by microorganisms and stimulating its recovery, with the additive membranes with olive leaf extract being highlighted mainly in the inhibition of microorganisms.

Keywords: Chitosan. Olive leaf extracts. Wound dressings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da recuperação de feridas e papel dos biopolímeros em cada uma delas.	21
Figura 2 - Estruturas da quitina e quitosana.	24
Figura 3 – Membranas de quitosana: a) pura; b) com adição de 0,5 % de extrato; c) com adição de 1,0 % de extrato.....	37
Figura 4 - MQP e MQE obtidas após secagem	45
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as membranas MQP e MQE.	46
Figura 6 - Análises de atividade antimicrobiana das membranas.	51
Figura 7 - Aparato das análises de permeação microbiana: a) 0 dias, b) 5 dias.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de espessura, tensão na ruptura (T) e alongamento (E%) das membranas de quitosana pura e aditivada com extrato de folhas de oliveira.	47
Tabela 2 - Resultados de permeabilidade ao vapor de água, intumescimento e solubilidade das MQP e MQE.....	49
Tabela 3 - Resultados de inibição microbiana das membranas.	51
Tabela 4 - Resultados de absorbância para análises de permeação microbiana.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de materiais poliméricos para curativos disponíveis nos mercados mundiais.	23
Quadro 2 - Propriedades de extratos de folhas de oliveira.	28
Quadro 3 - Principais estudos e resultados envolvendo extratos de folhas de oliveira no GPESP.	32
Quadro 4 - Incorporação de compostos naturais a biopolímeros para aplicação em tratamento de feridas.....	36

LISTA DE SIGLAS

EFO – extrato de folhas de oliveira

(GPEPSP) – Grupo de Pesquisa em Engenharia de Processos em Sistemas Particulados

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MQP – membrana de quitosana pura

MQE – membrana de quitosana aditivada com de extrato

LISTA DE SÍMBOLOS

- A – área exposta ou em contato
- A_a – atividade antioxidante
- A_{am} – atividade antimicrobiana
- A_C – absorbância do controle
- A_{EFO} – absorbância do extrato
- CMI – concentração mínima inibitória
- d_i – distância inicial das garras
- d_r – distância das garras na ruptura
- E – espessura
- $E\%$ - porcentagem de alongamento na ruptura
- F_m – força máxima na ruptura
- FT – compostos fenólicos totais
- HID – conteúdo de hidroxitirosol
- I – intumescimento
- m_{ab} – massa de água absorvida
- $m_{\text{água}}$ – massa de água
- m_f – massa da membrana após remoção do excesso de água
- $m_{f,s}$ – massa final do sistema
- m_i – massa da membrana antes da imersão em água
- $m_{i,s}$ – massa inicial do sistema
- $m_{s,s}$ – massa de sólido seco
- m_{total} – massa total
- OLE – conteúdo de oleuropeína
- PVA – permeabilidade ao vapor de água
- S – solubilidade em água
- t – tempo decorrido
- T – tensão máxima na ruptura
- TVA – taxa de transmissão de vapor de água
- $X_{b,s}$ – teor de umidade em base seca
- $X_{b,u}$ – teor de umidade em base úmida
- ΔP – diferença de pressão parcial através das membranas

SUMÁRIO

RESUMO	4
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Cicatrização de feridas	19
3.2 Biopolímeros e tratamento de feridas	19
3.2.1 Quitosana	24
3.3 Extratos naturais e tratamento de feridas	25
3.3.1 Extrato de folhas de oliveira	26
3.4 Incorporação de bioativos naturais a curativos biopoliméricos	35
4 METODOLOGIA	39
4.1 Obtenção dos extratos de folhas de oliveira	39
4.3 Obtenção e caracterização das membranas biopoliméricas	39
4.3.3 Caracterização das membranas biopoliméricas	40
4.3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura – (MEV)	40
4.3.3.2 Espessura – (E)	41
4.3.3.3 Ensaio mecânico – (T) e (E%)	41
4.3.3.4 Taxa de transmissão de vapor de água (TVA) e Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	41
4.3.3.5 Intumescimento – (I)	42
4.3.3.6 Solubilidade em água das membranas – (CDF)	43
4.3.3.7 Atividade antimicrobiana das membranas – (Aam)	43
4.3.3.8 Permeação microbiana das membranas	44
4.4 Análises estatísticas	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Caracterização das membranas	45
5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura – (MEV)	45
5.1.2 Espessura e ensaios mecânicos – (E), (T) e (E%)	47
5.1.4 Taxa de transmissão de vapor de água, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade e intumescimento das membranas	49

5.1.5 Atividade antimicrobiana das membranas e permeação microbiana.....	50
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Feridas, crônicas ou agudas, representam um grande encargo do ponto de vista socioeconômico e um problema de ordem mundial (alto custo e grande tempo de tratamento), sendo a abordagem clínica e manejo correto e eficiente essenciais em seu tratamento. As feridas crônicas ou agudas incluem feridas de pés de diabéticos, úlceras venosas e úlceras por pressão ou decúbito. Seu processo de recuperação envolve ao menos 3 fases distintas (reação inflamatória, proliferação celular para restauração do tecido e remodelagem do tecido injuriado) e sobrepostas ao longo do tempo que dependem grandemente da forma como são manejadas para cicatrizar (LAZARUS *et al.*, 1994; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009; ZIELINS *et al.*, 2014; FRYKBERG; BANKS, 2015).

O uso de terapias tópicas, como aplicação de curativos, é uma das maneiras mais comuns de tratar feridas e promover sua cicatrização. Curativos tradicionais como bandagens, naturais ou sintéticas, algodão e gazes foram muito utilizados no passado no manejo de feridas com a função primária de manter a ferida seca e prevenir a entrada de bactérias. Contudo, atualmente sabe-se que manter um ambiente úmido na região da ferida possibilita uma recuperação mais rápida e eficiente. Assim, um curativo ideal deve proteger a ferida de traumas e contaminação bacteriana, além de absorver exsudatos da ferida, manter a umidade necessária para a cicatrização, permitir oxigenação e, também, ser esteticamente agradável (EAGLSTEIN; FALANGA, 1997; LIONELLI; LAWRENCE, 2003; BOATENG *et al.*, 2008). Os biomateriais desempenham importante papel na engenharia de tecidos. São capazes de repor ou suplementar funções dos tecidos e órgãos do corpo e estão aptos a permanecer em contato com tecidos ou fluidos corporais por longos períodos, sem apresentar reações indesejadas. Curativos bioativos e algumas formulações sintéticas ou semi-sintéticas de polímeros são também capazes de promover a cicatrização de feridas (KUMAR; ANANDHAVELU; SUATHY, 2019; SHAH *et al.*, 2019).

Dentre os biomateriais, os biopolímeros de fontes renováveis têm chamado atenção há algum tempo, principalmente devido às preocupações crescentes com o meio-ambiente. Isso deve-se ao fato de poderem substituir os polímeros convencionais de origem petroquímica e não renováveis, e prevenir danos ambientais após seu descarte devido à sua biodegradabilidade, além de sua viabilidade econômica. Ainda, do ponto de vista das aplicações biomédicas e farmacêuticas apresentam vantagem por poderem sofrer modificação química e serem, em geral, biocompatíveis (YU; CHEN, 2009; VISHAKHA; KISHOR; SUDHA, 2012; THONPHO; SRIHANAM, 2016).

Além das características já mencionadas, os biopolímeros podem, em muitos casos, apresentar outras características interessantes no tratamento de feridas, e na composição de curativos, tais como antibacterianas, anti-inflamatórias e promotoras de crescimento celular (KUMAR *et al.*, 2018).

Produtos de origem natural também têm sido largamente utilizados historicamente no tratamento de feridas, com muitas vantagens. Extratos de plantas ou substâncias de origem natural podem conter químicos benéficos como antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios e promotores da cicatrização. Estes químicos podem apresentar um papel específico no tratamento de feridas (SIVAMANI *et al.*, 2012; IBRAHIM *et al.*, 2018).

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das frutíferas domesticadas mais antigas, desenvolvendo-se bem em regiões de climas tropical e temperado (COUTINHO *et al.*, 2009). O Rio Grande do Sul, principalmente a região da Campanha Gaúcha no sul do estado, é o maior produtor de azeite de oliva do país com grande área plantada destas frutíferas (cerca de 7000 ha) (IBRAOLIVA, 2020). Na olivicultura, as folhas das plantas são consideradas um subproduto e geradas em grande quantidade, podendo cada planta produzir cerca de 25 kg de folhas anualmente, principalmente durante o período de poda das plantas (BOUDHRIOUA *et al.*, 2009). Estas folhas, por sua vez, possuem compostos que podem apresentar atividades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (LEE; LEE, 2010).

Muitas plantas e seus extratos tem sido tradicionalmente usados no tratamento de feridas, induzindo a cicatrização e regeneração de tecidos, com o mínimo de efeitos adversos. A extração é o primeiro passo para obtenção destes extratos e esforços consideráveis têm sido gastos para obter métodos mais eficientes de extração que resultem em extratos mais eficazes. Assim, atualmente são visadas as chamadas “técnicas verdes” de extração, que utilizam sínteses químicas menos perigosas, solventes mais seguros, maior eficiência energética, redução de subprodutos e não-decomposição das amostras (GUPTA; NARANIWAL; KOTHARI, 2012; AZMIR *et al.*, 2013; MAVER *et al.*, 2015).

No contexto da utilização de biopolímeros e extratos naturais o Grupo de Pesquisa de Engenharia de Processos em Sistemas Particulados da Universidade Federal do Pampa tem desenvolvido nos últimos anos diversos estudos voltados à identificação, quantificação e extração de compostos bioativos presentes em diferentes produtos naturais, como frutos e folhas, principalmente endêmicos ou economicamente relevantes na região geográfica em que o grupo se insere. O grupo tem desenvolvido também diversos estudos na formulação de materiais biopoliméricos, principalmente voltados à proteção e conservação de alimentos e utilização de biopolímeros de fontes renováveis e abundantes tais como gelatina, carragenana e quitosana.

Considerando a união dessas duas áreas de pesquisa, os avanços do grupo reportam a incorporação de compostos bioativos de origem natural às matrizes biopoliméricas, visando principalmente a obtenção de embalagens ativas e inteligentes com potencial para aplicações em alimentos. Rosa *et al.* (2017), desenvolveram filmes compostos por gelatina e extrato de folhas de oliveira com o intuito de obter embalagens ativas para proteção de alimentos. Rosa *et al.* (2019a), Rosa *et al.* (2019b), Martiny *et al.* (2020a), Martiny *et al.* (2020b) e Martiny *et al.* (2021), realizaram estudos sobre a influência do uso de diferentes técnicas e condições de extração na obtenção dos compostos bioativos presentes nas folhas de oliveira do cultivar Arbequina. Os resultados indicaram elevado conteúdo de compostos antioxidantes e antimicrobianos, o que motivou a aplicação desse extrato como aditivo natural para obtenção de filmes biopoliméricos com caráter ativo para serem aplicados em embalagens de alimentos.

Dado esse histórico, a presente pesquisa propõe uma abordagem diferente das até então empregadas nas pesquisas do grupo, visando a obtenção de uma matriz biopolimérica de quitosana – devido ao fato de ser um resíduo abundante do processamento de alimentos – aditivada com extrato natural de folhas de oliveira com potencial de aplicação no tratamento e recuperação de feridas. Espera-se, como diferencial, propor avanços científicos que culminem com o desenvolvimento de um produto que alie as boas propriedades do biopolímero com as do extrato de origem natural e que se apresente como uma alternativa realmente viável a aplicação que se propõe.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obter e caracterizar membrana biopolimérica à base de quitosana aditivada com extrato natural de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) com propriedades antimicrobianas e potencial para aplicação tópica no tratamento de feridas.

2.2 Específicos

- Obter membrana biopolimérica controle (sem adição de extrato) e caracterizar suas propriedades físicas, químicas, morfológicas, mecânicas e de barreira;
- Obter extratos naturais provenientes das folhas de oliveira por metodologia amigável ao meio ambiente;
- Incorporar extrato de folhas de oliveira à membrana biopolimérica e caracterizá-la quanto a suas propriedades física, química, morfológica, mecânica e de barreira, bem como avaliar seu potencial de atuação como barreira a micro-organismos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cicatrização de feridas

Feridas são uma disfunção da estrutura e da função anatômica normal, resultante de processo patológico interno ou externo ao órgão afetado (LAZARUS *et al.*, 1994). De acordo com Velnar; Bailey e Smrkoj (2009), podem ser classificadas de acordo com vários critérios, dentre os quais, o tempo é um importante fator na gestão de lesões e cura das feridas. Assim, feridas agudas são aquelas causadas por fatores envolvendo lesões traumáticas, como queimaduras ou cirurgicamente geradas, mas que curam em tempo hábil e sem complicações, enquanto feridas crônicas são aquelas causadas por disfunções metabólicas e que levam um grande período de tempo para curarem – úlceras em pés de diabéticos, por exemplo – e podem sofrer complicações durante o processo de recuperação (ROBSON; STEED, 2001; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; IRFAN-MAQSOOD, 2018).

O processo de cicatrização de feridas é complexo e envolve, em geral, três fases não-lineares mas que sobrepõem-se ao longo do tempo. Na primeira delas, reação inflamatória, há as respostas vasculares como coagulação do sangue e liberação de leucócitos, que iniciarão o processo de reparo. Na segunda fase, de proliferação, há formação de tecido epitelial para cobertura da superfície da ferida ao mesmo tempo em que é produzido tecido granular para preencher os vazios da ferida, pela proliferação de fibroblastos e matrizes extracelulares, como colágenos, além de novos vasos sanguíneos. Uma vez que novos tecidos tenham sido formados, inicia-se a terceira fase, de remodelagem, em que há a restauração da integridade estrutural e funcional dos tecidos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

De acordo com Guo e DiPietro (2010), os fatores que podem afetar a cicatrização de feridas podem ser classificados em locais – que influenciam diretamente a ferida, como oxigenação, umidade e *stress* mecânico – e sistêmicos – relativos à saúde geral ou estado do indivíduo que afetam sua habilidade de se curar, como idade, consumo de álcool e tabagismo, obesidade, diabetes e outros. Dentre as formas de favorecer a cicatrização de feridas, pode-se destacar a aplicação de curativos tópicos e, assim, a utilização de materiais como os biopolímeros.

3.2 Biopolímeros e tratamento de feridas

Polímeros convencionais, como polietileno, polipropileno e poliuretano, são largamente utilizados mundialmente e tem sua origem principal em fontes não renováveis, como o petróleo,

carvão mineral e gás natural. Todavia, estes materiais persistem no meio-ambiente por um longo período após seu descarte, tornando-os inadequados para aplicações em que são utilizados por um curto período (GROSS; KALRA, 2002; DiGREGORIO, 2009).

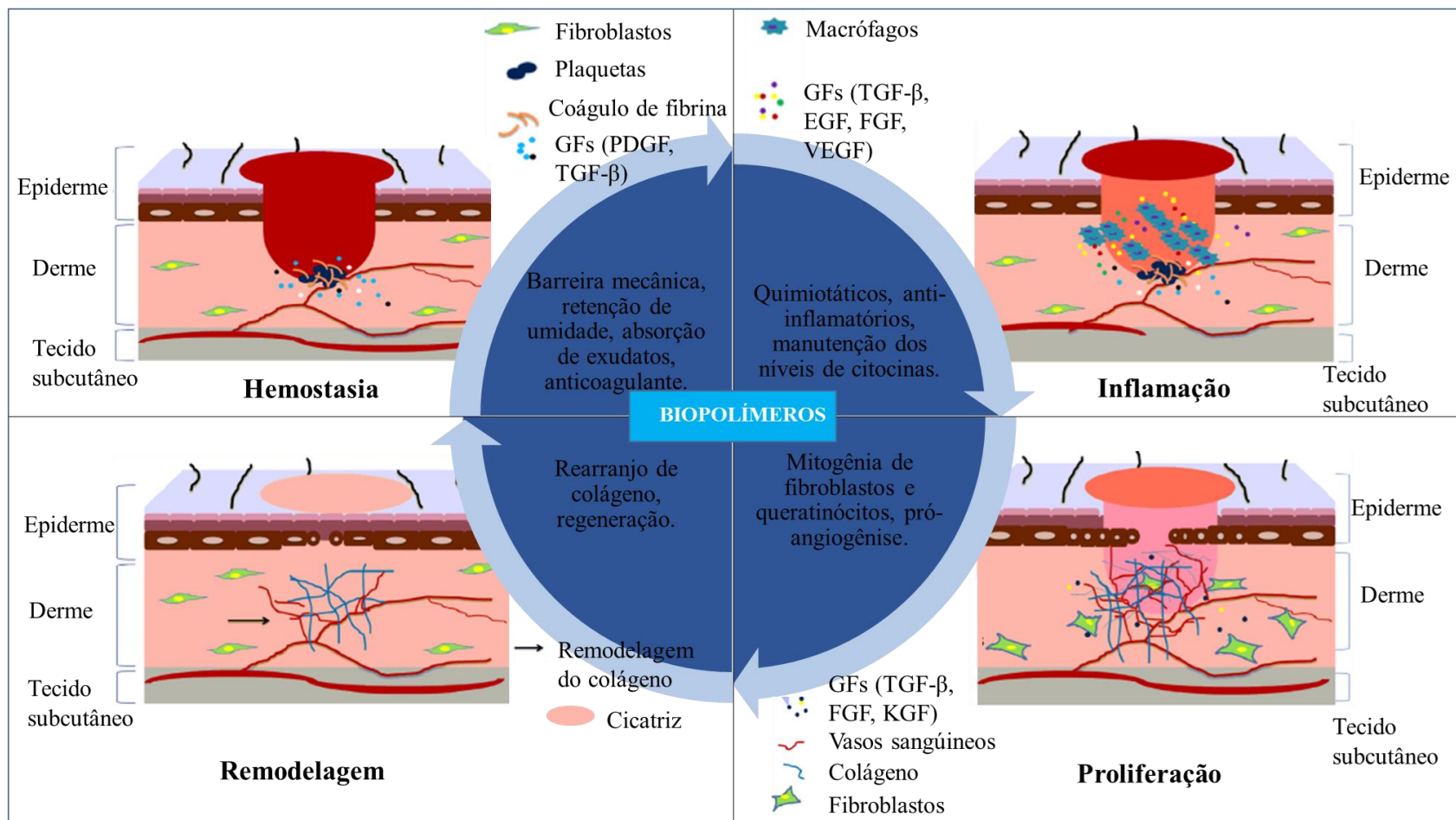
Por isso, de acordo com Yu e Chen (2009), polímeros de fontes renováveis tem chamado atenção por duas razões principais: preocupações com o meio-ambiente e o conhecimento de que os recursos disponíveis de fontes não-renováveis são finitos. Além disso, são uma possível fonte de renda para os atores envolvidos em sua produção.

Biopolímeros são aqueles formados na natureza durante os ciclos de crescimento de organismos vivos envolvendo, normalmente, reações catalisadas por enzimas, polimerização em crescimento de cadeia de monômeros ativados e formados pelas células em processos metabólicos complexos. Podem ser classificados de acordo com sua composição química, origem e método de síntese, método de processamento, importância econômica e aplicação, além de outros parâmetros (GHANBARZADEH; ALMASI, 2013).

As aplicações destes materiais são, de acordo com Van de Velde e Kiekens (2002), bastante diversificadas, podendo destacar-se aplicações em embalagens – de alimentos e embalagens em geral – e na área médica – sistemas de liberação de drogas, implantes cirúrgicos, proteção e recuperação de feridas e engenharia de tecidos.

Em relação a estas duas últimas aplicações, Sahana e Recka (2018), mencionam que biopolímeros como colágeno, celulose, quitosana, alginato e carregenana, podem apresentar propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias ou estimuladoras da proliferação celular, que desempenham papel fundamental no processo de cura de feridas, além de possuírem propriedades que permitem que sejam moldados em hidrogéis, suportes e blendas com outros polímeros, com inúmeras possibilidades de aplicação como substituintes de pele. Em seu trabalho apresentam um esquema do papel que deve ser desempenhado por biopolímeros em cada etapa do processo de cicatrização de feridas, mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Fases da recuperação de feridas e papel dos biopolímeros em cada uma delas.



Fonte: Adaptado de Sahana e Recka (2018).

De acordo com a Figura 1, a primeira etapa da recuperação de feridas consiste na hemostasia, em que a função dos biopolímeros pode ser fornecer barreira mecânica para proteção, reter umidade, absorver exsudatos ou atuar como anti-coagulantes. Na etapa de inflamação, podem desempenhar função quimiotática, favorecendo a migração celular, função antibacteriana e, também, controladora dos níveis de citocinas, controlando a inflamação. Na fase de proliferação, podem atuar como agentes mitogênicos, favorecendo a migração celular de fibroblastos e queratinócitos e agentes estimuladores da formação de novos vasos sanguíneos. Por fim, na fase de remodelagem, podem atuar como promotores do rearranjo do colágeno e regeneração (cicatrização) da área ferida. (SAHANA; RECKA, 2018).

Kumar *et al.* (2018), também destacam que a aplicação de biomateriais desperta grande interesse na cura de feridas e que sua aplicação para fins clínicos e biomédicos é devida à sua versatilidade, que inclui boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de não imunogenicidade.

Smith, Moxon e Morris (2016), afirmam que uma das maiores vantagens da utilização de biopolímeros no tratamento de feridas é devida à sua habilidade de absorção de água quando secos e liberação dela quando hidratados, além das formulações com esse tipo de material poderem ser carregadas com drogas para liberação controlada e moldadas para utilização como suportes de crescimento para células na engenharia de tecidos.

Comercialmente, entretanto, a utilização de biopolímeros como curativos ainda é limitada. O Quadro 1, adaptado de Kamoun; Kenawy e Chen (2017), apresentam uma lista de materiais poliméricos para curativos disponíveis no mercado mundial. Dele, pode-se observar o destaque para curativos biopoliméricos à base de poliálcoois, alginatos e hidrocolóides.

Quadro 1 - Lista de materiais poliméricos para curativos disponíveis nos mercados mundiais.

Tipo de curativo		Marcas comerciais	Descrição	Aplicação	Utilização global (%)
Materiais de curativos artificiais	Filmes poliméricos	Tegaderm; Blister; Poly skin II; Silon-TSR Opsite, Aluderm	Filmes sintetizados de poliuretano ou outro material polimérico	Feridas superficiais; feridas de procedimentos de rejuvenescimento causadas por lasers; defeitos de origem cirúrgica; feridas com exsudato	8,0
	Espumas poliméricas	Flexzan; Biopatch; Crafoams; Biatain; Cutinova; Reston; Lyofoam; Ivalon	Sintetizadas de espumas hidrofílicas e suporte hidrofóbico ou semi-permeável em membranas não absorventes, p.e., polioxietileno glicol cercado por poliuretano ou silicone/poliéster.	Feridas crônicas; queimaduras; ferimentos cirúrgicos; ferimentos por procedimentos de rejuvenescimento a laser.	5,0
	Hidrogéis poliméricos	Cultinova Gel; Biolex; TegaGel; Carrasyn; Nugel; 2nd Skin Flexderm; Exu Dry Dressing; CarraSorb; GRX wound Gel	Hidrogéis são sintetizados por reticulação de polímeros hidrofílicos, p.e., polivinilálcool, polivinil pirrolidíne ou óxido de polietileno	Úlceras; ferimentos por rejuvenescimento a laser; incisões de profundidade moderada; feridas em partes doadoras de enxertos ou órgãos transplantados.	43,0
	Alginatos poliméricos	AlgiSite; AlgiDerm; Sorbsan; Kaltostat; Omiderm	Hidrogéis de alginato são sintetizados pela reticulação de alginato de sódio com soluções salinas de Ca, Mg ou Zn;	Queimaduras superficiais; ferimentos cirúrgicos; feridas muito exsudativas; úlceras crônicas	20,0
	Hidrocolóides poliméricos	Iodosorb (Cadexômero); Debrisan (Dextranômero); Sorbex, Duoderm (blenda polimérica)	Hidrocolóides são sintetizados por imobilização de iodo em amido modificado hidrossolúvel baseado em cadexômero de iodo. O gel é formado pela troca de iodo entre o material polimérico e exsudatos da ferida. A segunda forma é dextranômero, que consiste em dextrano reticulado e enxertado com polietileno glicol.	Úlceras crônicas; queimaduras; feridas de profundidade moderada; feridas em partes doadoras de enxertos.	24,0

Fonte: Adaptado de Kamoun; Kenawy e Chen., (2017).

Apesar de comercialmente ainda não ser utilizada, dentre os biopolímeros a quitosana exibe propriedades excepcionais além de biocompatibilidade e biodegradabilidade tornando-a uma excelente opção, especialmente na engenharia de tecidos e aplicação na recuperação de feridas (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

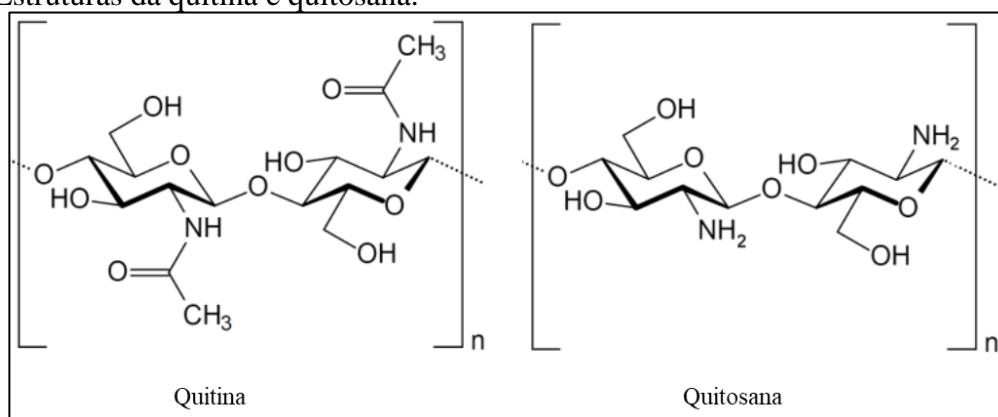
3.2.1 Quitosana

Quitosana é um derivado da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose. A quitina pode ser encontrada em insetos, ostras, algas e até fungos, mas sua principal fonte de obtenção são as carapaças de crustáceos, como caranguejos e camarões, possibilitando que seja isolada dos rejeitos da indústria de processamento de frutos do mar para alimentação (YILMAZ, 2004).

A quitosana pode ser obtida por meio da desacetilação parcial da quitina, em meio alcalino e sua estrutura é composta por dois copolímeros: glucosamina (β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose) e N-acetilglucosamina (β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose) (BALDRICK, 2010; YILMAZ, 2004).

As estruturas da quitina e da quitosana são ilustradas na Figura 2.

Figura 2 - Estruturas da quitina e quitosana.



Fonte: Adaptado de Younes e Rinaudo (2015).

De acordo com Rinaudo (2006), quando o grau de desacetilação da quitina é superior a 50%, ela passa a ser chamada quitosana e se torna solúvel em solução aquosa ácida, formando um polieletrólito, o que permite que seja utilizada em diversas aplicações como soluções, géis, filmes e fibras.

Muxica *et al.* (2017) apontaram em seu trabalho as principais formas de processamento e áreas de aplicação da quitosana. Quanto ao processamento, relatam sua capacidade de formação de filmes por *casting* ou compressão, formação de coberturas por gotejamento ou *spray*,

formação de estruturas porosas por liofilização, formação de blendas com outros polímeros e biopolímeros, formação de membranas por deposição camada-por-camada e até impressões 3D. Dentre as áreas de aplicação, relatam que além de poder ser aplicada nas indústrias de cosméticos, de papel, tratamento de efluentes e agricultura, pode ser largamente utilizada na biomedicina na liberação controlada de medicamentos, curativos para feridas, engenharia de tecidos, biomaterial de regeneração para ossos e agente antimicrobiano ou anticoagulante sanguíneo.

A quitosana tem sido largamente utilizada para recuperação de feridas, como curativo de uso tópico devido à sua ação hemostática, estímulo à cicatrização, propriedades antimicrobianas, biocompatibilidade e biodegradabilidade (UENO; MORI; FUJINAGA, 2001; DAI *et al.*, 2011; PATRULEA *et al.*, 2015). Pode ser utilizada na forma de hidrogéis, filmes, membranas, esponjas e pós e apresenta a habilidade de carregar agentes antimicrobianos extrínsecos ou atuar como veículo para liberação controlada de drogas e fatores de crescimento, favorecendo a cicatrização (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

Bano *et al.* (2017) revisam as propriedades da quitosana e seus derivados em aplicações na recuperação de feridas. Destacam que ela pode ser utilizada como curativos com alta durabilidade, boa biocompatibilidade, não-toxicidade e boa capacidade de absorção de água. Além disso, pode contribuir para aceleração da cicatrização e atuar como agente hemostático, antimicrobiano e analgésico.

Madni *et al.* (2021) destacam que a quitosana é adequada para diferentes aplicações na engenharia de tecidos, como no desenvolvimento de suportes para crescimento celular. Ela pode ser obtida de diferentes fontes (fungos, organismos terrestres e aquáticos) e por métodos químicos ou enzimáticos, apresentando propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, hemocompatíveis, anti-fúngicas e antimicrobianas. Além disso, pode ser processada por diferentes métodos, como *casting*, compressão e liofilização, resultando em diferentes materiais como hidrogéis, membranas e esponjas, com propriedades diversas na engenharia de tecidos.

Por isso, a quitosana é um biopolímero promissor para o desenvolvimento de formulações para aplicação como curativos no tratamento e recuperação de feridas, que será o foco deste trabalho. Também, levando em conta a capacidade deste polímero atuar como veículo para liberação controlada de drogas, será explorada sua combinação com extratos naturais contendo compostos bioativos, com propriedades favoráveis à recuperação de feridas.

3.3 Extratos naturais e tratamento de feridas

Por centenas de anos, a humanidade tem utilizado plantas como uma forma de amenizar sintomas ou curar doenças. Tais plantas constituem uma fonte de novos compostos para utilização na medicina e em outras aplicações como alcaloides, esteroides, taninos, óleos aromáticos, resinas, fenóis, flavonoides, dentre outros, que podem ser encontrados em suas folhas, cascas, flores, frutos e raízes (GUPTA; NARANIWAL; KOTHARI, 2012).

De acordo com Süntar *et al.* (2012) o uso de extratos ou derivados de plantas no tratamento e manejo de feridas é bem documentado e a presença de antioxidantes em vários deles é bem conhecida. Também, muitos destes compostos demonstraram atividade de cicatrização de feridas. Como exemplo, Sivamani *et al.* (2012) relataram em seu trabalho a atividade de potencialização da cura de feridas de folhas de bananeira, frutos de cacau, cascas de árvores, e outras fontes naturais.

Bedi e Shenefelt (2002), exploraram em seu trabalho a aplicação de substâncias derivadas de plantas em aplicações dermatológicas. Destacaram por exemplo a atividade de taninos obtidos de cascas de árvores, bem como ácidos de frutas (maléico, cítrico, glucônico, tartárico) e óleo da árvore de chá no tratamento de acnes. Também, reportaram a utilização de aloe vera e óleo de calêndula como aceleradores no processo de cicatrização de feridas e queimaduras.

A literatura é rica em reportar as possibilidades de aplicação de compostos de origem natural na terapia de feridas, mas também ressalta que seu potencial ainda é altamente explorável, o que viabiliza a continuidade de investigação na área.

3.3.1 Extrato de folhas de oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das frutíferas domesticadas mais antigas, tendo a origem de seu cultivo na região oriental do mar Mediterrâneo, depois difundindo-se para todo mundo. Os derivados dessa planta têm sido utilizados, historicamente, não só na alimentação como também na medicina popular como afrodisíacos, laxativos, tônicos, emolientes e sedativos (GOMES; MARTINS-LOPES; GUEDES-PINTO, 2012; MACHADO, 2013; WATERMAN; LOCKWOOD, 2007).

No Brasil, sua cultura foi introduzida no início do século XX, principalmente em Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul (OLIVEIRA, 2009). No RS, maior área plantada do país, a produção saltou de 80 para 6 mil hectares plantados entre 2005 e 2020, principalmente na metade sul do estado do Rio Grande do Sul (SEAPI/RS, 2020). Destaca-se neste estado, e no cenário nacional, a região da Campanha Gaúcha, principalmente após a implantação do projeto Olivais do Pampa. Este projeto insere-se no contexto do programa Brasil Próximo,

programa de cooperação internacional que visa aproximar regiões italianas e brasileiras a fim de promover o desenvolvimento integrado do território.

O projeto abrange os municípios de Bagé, Aceguá, Candiota, Hulha Negra, Caçapava do Sul e Santana do Livramento e tem por objetivo promover e apoiar o cultivo de oliveiras e produção local de azeite extra-virgem (BRASIL, 2020). Destaca-se ainda na região o município de Pinheiro Machado, identificado como a melhor localidade do Brasil para cultivo de oliveiras, devido a aspectos de clima, solo e altitude, sendo que na Fazenda Guarda Velha, nele localizada, encontra-se a maior produção de azeitonas do país, com 90 mil pés cultivados em 300 hectares, até 2017 (PINHEIRO MACHADO/RS, 2017).

Na prática da olivicultura, as folhas de oliveira são um subproduto, disponíveis em grandes quantidades (GUINDA *et al.*, 2004). Essas folhas são ricas em polifenóis e têm sido utilizadas historicamente pela medicina popular no combate a febres e outras doenças (BENAVENTE-GARCÍA *et al.*, 2000; PACETTA, 2013). O extrato dessas folhas é, por sua vez, um líquido de gosto amargo e aspecto marrom (JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ; CASTRO, 2006; SUDJANA *et al.*, 2009).

O extrato das folhas de oliveira, devido aos compostos biofenólicos nele contidos, apresentam propriedades interessantes para aplicação no tratamento de feridas, como antioxidante e antimicrobiana, dentre outras, reportadas pela literatura. O Quadro 2 reporta as principais informações sobre as propriedades do extrato da folha de oliveira relatados por alguns autores.

Quadro 2 - Propriedades de extratos de folhas de oliveira.

Autores	Cultivar / Origem	Método extração / Condições	Solvente utilizado	Principais características do extrato
Korukluoglu; Sahan; Yigit (2007)	Não especificado / Bursa, Turquia.	Extração a partir de 60 g de folhas frescas e trituradas em liquidificador caseiro, e realizada em <i>Soxhlet</i> por 8 h com diferentes solventes, seguida de concentração em rota-evaporador e refrigeração até utilização. / Extrato aquoso obtido por adição de folhas moídas em pó a água (20 % p/v) e autoclave por 20 min a 121 °C. Em seguida, coaram-se as folhas e autoclavou-se o extrato resultante novamente, armazenando-o a 4 °C.	Metanol, acetona, dietil-éter, água.	Atividade antifúngica dos extratos (especialmente o aquoso) contra várias cepas de fungos testados.
Lee e Lee (2010)	Não especificado / Austrália.	Folhas lavadas e secas a 40 ± 5 °C por 6 h. Extrato obtido pela adição de 250 g de folhas em pó (20 - 30 mesh) submetidos a refluxo 10 vol (v/p) com solução de etanol 80 % a 80 °C por 3 h, por 3 vezes seguidas. Extrato filtrado em filtro <i>Whatman</i> (n° 2), concentrado em evaporador a vácuo e seco em liofilizador.	Água; etanol.	Atividade antimicrobiana contra <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. enteritidis</i> .
Wainstein <i>et al.</i> (2012)	Barnea / Jezreel Valley – Israel	Folhas <i>in natura</i> lavadas com água destiladas e moídas. Obtenção dos extratos das folhas moídas por extração em <i>Soxhlet</i> , primeiro com hexano (3h), depois com solução de etanol 80% (6h). Concentração posterior do extrato alcoólico a 25 °C e pressão reduzida.	Hexano; etanol; água.	Efeito hipoglicêmico quando administrado a pacientes com diabetes.
Samancioglu <i>et al.</i> (2016)	Não especificado / Balikesir – Turquia	Folhas secas sob vácuo. Imersão das folhas secas em solução de álcool etílico 78 % por 48 h e então filtradas. A solução resultante foi submetida a secagem em secadora spray e obtenção de extrato em pó.	Etanol.	Efeito de inibição antimicrobiana contra 6 diferentes cepas de bactérias.

Qabaha <i>et al.</i> (2017)	Nabali / Ramallah, Palestina	Folhas secas a 30 °C e trituradas. Extração por adição de 5 g de folhas secas a 50 mL de etanol por 3 h a 40 °C. O extrato líquido foi filtrado a vácuo e submetido a concentração em evaporador rotativo para obtenção do extrato bruto.	Etanol.	Atividade anti-inflamatória inibidora da produção de fator de necrose tumoral (TNF α) e propriedades antibacterianas contra <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> .
Erdogan <i>et al.</i> , 2018	Não especificado / Esmirna – Turquia	Folhas secas a temperatura ambiente e moídas em moedor de café. Extração com solução aquosa de etanol 70% na razão 1:20 sólido-líquido com agitação a 180 rpm e temperatura ambiente por 2 h. Após, filtração do extrato e evaporação do etanol a 40 °C seguida de centrifugação do extrato aquoso a 4000 rpm por 5 minutos para remoção dos sólidos.	Água, etanol.	Potencial antimicrobiano contra <i>E. coli</i> e <i>S. epidermidis</i> , além de atividade antioxidante e estimuladora do crescimento celular na recuperação de feridas.

Fonte: Autor (2022).

Korukluoglu, Sahan e Yigit (2008) avaliaram as propriedades antimicrobianas de extratos de folhas de oliveiras e seus compostos fenólicos contra 30 fungos diferentes. Utilizaram o método da disco-difusão para avaliar o potencial de inibição dos extratos e seus resultados mostraram que o extrato aquoso apresentou o efeito inibitório mais proeminente, inibindo completamente o crescimento de 10 cepas de fungos (*A. alternata*, *A. elegans*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. wentii*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *P. italicum*, *P. roqueforti* e *P. verrucosum*).

Lee e Lee (2010), avaliaram as propriedades antimicrobianas e antioxidantes de compostos fenólicos, isolados e combinados, presentes nos extratos de folhas de oliveira e puderam verificar ambas as propriedades em testes *in vitro*. Utilizando o método de difusão de disco de papel para avaliar a atividade antimicrobiana contra 4 micro-organismos (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. enteritidis*) verificaram que uma mistura contendo os principais compostos fenólicos presentes em extratos de folha de oliveira (oleuropeína, rutina, vanilina e ácido caféico) na razão em que são encontrados nos extratos, apresentou inibição de $28,5 \pm 0,3$ mm contra *B. cereus* e $24,5 \pm 0,5$ mm contra *S. enteritidis*.

Wainstein *et al.* (2012), relataram efeitos dos extratos de folhas de oliveira na diminuição da taxa glicêmica em testes com humanos e ratos, além de outros efeitos, como antioxidantes.

Qabaha *et al.* (2017), relataram atividades anti-inflamatórias e antibacterianas de extrato de folhas de oliveira, observadas *in vitro*, principalmente devido à presença de oleuropeína no mesmo. Realizaram testes com micro-organismos, comparando a atividade antimicrobiana do extrato com neomicina na inibição de 4 micro-organismos diferentes. Embora não tenham detectado ação contra *P. aeruginosa* e *E.coli*, encontraram cerca de $13,1 \pm 0,1$ mm de inibição contra *S. aureus* e $14,3 \pm 0,1$ mm de inibição contra *S. epidermidis*, em testes de difusão em placas.

Quanto à aplicação no tratamento de feridas, Samancioğlu *et al.* (2016) testaram o potencial de cicatrização de feridas induzidas, em ratos saudáveis e diabéticos, de gazes embebidas em extrato de folhas de oliveira ricos em oleuropeína. Utilizando o método da microdiluição, verificaram que a concentração mínima inibitória de extrato de folhas de oliveira, em comparação com grupos controle de antimicrobianos convencionais (gentamicina e ampicilina) variou de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$. O extrato mostrou-se efetivo contra 6 dentre 8 cepas de bactérias clinicamente isoladas, nomeadamente: *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *K pneumoniae*, *E. cloacae*, *E faecalis* e *S. epidermidis*. Concluíram que curativos para feridas contendo extratos de folhas de oliveira são uma opção viável no tratamento de feridas de diabéticos.

Erdogan *et al.* (2018), avaliaram o potencial de aplicação de extrato de folhas de oliveira, bruto e fracionado, para cicatrização de feridas, em testes *in vitro*. Também relatam atividade bacteriostática e antioxidante dos extratos, além de potencial cicatrizante e estimulador de migração celular, principalmente devido à presença do composto oleuropeína no extrato.

No Grupo de Pesquisa em Engenharia de Processos em Sistemas Particulados (GPEPSP), da Universidade Federal do Pampa, campus Bagé/RS, alguns trabalhos já foram desenvolvidos a fim de caracterizar os compostos presentes nas folhas de oliveira do cultivar Arbequina, cultivado no município de Pinheiro Machado/RS, e suas propriedades bioativas.

O Quadro 3 sumariza as técnicas de extração e os principais resultados da caracterização dos extratos de folhas de oliveira obtidos e estudados até o momento no GPEPSP.

Quadro 3 - Principais estudos e resultados envolvendo extratos de folhas de oliveira no GPESP.

Autores	Técnica de extração	Solvente	FT (mg _{GAE} ·g ⁻¹ b.s.)	A _a (%)	OLE (mg _{OLE} ·g ⁻¹ b.s.)/ HID (mg _{HID} ·g ⁻¹ b.s.)	A _{am} (%) – contra <i>E. coli</i>	CMI (mg.mL ⁻¹)
Rosa <i>et al.</i> (2017)	Maceração	Água	-	-	-	64,87	-
Rosa <i>et al.</i> (2019a)	Maceração	Água	57,28	67,25	-	-	-
		Etanol 40 %	98,14	91,81	-	-	-
		Etanol 70 %	115,75	93,09	-	-	-
	Extração as- sistida por micro-ondas	Água	59,64 – 105,05	56,70 – 94,40	-	-	-
		Etanol 40 %	87,98 – 132,40	83,67 – 94,35	-	-	-
		Etanol 70 %	108,13 – 157,62	90,79 – 93,35	-	-	-
	Extração as- sistida por ultrassom	Água	57,37 – 79,77	75,54 – 83,80	-	-	-
Rosa <i>et al.</i> (2019b)	Extração as- sistida por micro-ondas	Água	104,22	90,03	14,468 / 0,590	-	-
Martiny <i>et al.</i> (2020a)	Maceração	Água	41,40	-	-	100	-
Martiny <i>et al.</i> (2020b)	Extração as- sistida por micro-ondas	Água	115,96	89,52	11,59 / -	-	50,0
Rosa <i>et al.</i> (2021)	Maceração	Água	57,28	67,25	0,051 / 0,027	-	-

	Extração assistida por micro-ondas	Água	104,22	90,03	14,468 / 0,590	23,0 – 100,0	50,0
	Extração assistida por ultrassom	Água	80,51	91,45	6,914 / 0,547	80,9 – 91,8	
Martiny <i>et al.</i> (2021)	Extração assistida por micro-ondas	Água	67,84 – 119,16	77,57 - 93,58	11,59 / -	100,0	50,0

Fonte: Autor (2022).

Cagliari (2017), estudou a influência da secagem convectiva em leito fixo sobre as propriedades dessas folhas. Quantificou os compostos fenólicos totais presentes nas mesmas, *in natura* e após secagem, além da atividade antioxidante em termos do percentual de inibição do radical DPPH, o qual foi superior a 90,0 % em ambos os casos.

Rosa *et al.* (2017), avaliaram as propriedades antimicrobianas de extratos aquosos de folhas de oliveiras da mesma origem que Cagliari (2017), para adição a biofilmes de gelatina para proteção de alimentos. Embora não tenham caracterizado os compostos presentes nos extratos, realizaram testes de inibição antimicrobiana de *E. coli* e *S. aureus* em função das condições de extração. Seus resultados mostraram que a uma temperatura de extração de 75 °C por um período de 24 h, o potencial de inibição para *E. coli* foi superior a 60,0 % enquanto para *S. aureus*, superior a 60,0 %.

Rosa *et al.* (2019a), estudaram os efeitos dos métodos de extração na obtenção de extratos de folhas de oliveira do cultivar Arbequina da Região de Pinheiro Machado. Utilizaram a extração por maceração, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom, utilizando água e etanol como solventes. Caracterizaram os diferentes extratos obtidos quanto a seu conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Demonstraram que a extração assistida por micro-ondas a alta temperatura (86°C) foi mais eficiente em termos de conteúdo de compostos fenólicos totais, com extração curta (3 min) e que água é um bom solvente neste caso, causando a ruptura das células das folhas e promovendo a liberação de compostos fenólicos. Além disso, demonstraram que a atividade antioxidante dos extratos está diretamente relacionada com a quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos, sendo maior quanto maior a presença desses compostos.

Rosa *et al.* (2019b) deram sequência ao trabalho de Rosa *et al.* (2019a) e avaliaram os compostos fenólicos presentes em extratos obtidos por extração assistida por micro-ondas, objetivando sua incorporação, em diferentes concentrações, a filmes biodegradáveis de carragenana para aplicação em embalagens de alimentos. O extrato que obtiveram apresentou grande capacidade antioxidante – 90,03 % – para a aplicação proposta e conteúdos de oleuropeína e hidroxitirosol de 14,47 mg_{OLE}.g⁻¹ b.s. e 0,59 mg_{HID}.g⁻¹ b.s. Também, os filmes incorporados com o extrato apresentaram incremento na capacidade de alongamento, redução na tensão de ruptura e alta permeabilidade a vapor de água, apresentando boas propriedades de barreira e mecânicas.

Martiny *et al.* (2020a) e Martiny *et al.* (2020b) desenvolveram filmes à base de carragenana, que no primeiro caso extraíram de algas vermelhas *Gigartina skottsbergii* e no último adquiriram de fonte comercial, aditivando-os com extrato de folhas de oliveira do cultivar

Arbequina, também da região de Pinheiro Machado – RS, para aplicação como embalagem alimentar na proteção de carne de cordeiro. A metodologia de obtenção do extrato de folhas de oliveira em cada trabalho também foi diferente, sendo que Martiny *et al.* (2020a) obtiveram-no por maceração e Martiny *et al.* (2020b) utilizaram a extração assistida por micro-ondas. Em ambos os casos, caracterizaram o extrato quanto a seus compostos fenólicos, atividade antioxidante, conteúdo de oleuropeína e concentração mínima inibitória contra *E. coli*. Seus resultados mostraram que o extrato apresentou excelentes características, além de sua adição resultar em incremento da espessura, alongação na ruptura e permeabilidade ao vapor de água e diminuição da tensão na ruptura e módulo elástico dos filmes obtidos. A aplicação dos filmes durante o armazenamento de carne de cordeiro resultou na redução da contagem de micro-organismos mesófilos no primeiro caso e psicrófilos no último em comparação com o controle e com filme comercial. Os filmes por eles obtidos demonstraram, então, potencial aumento da vida de prateleira da carne de cordeiro, bem como de uso como embalagem ativa.

Pelo exposto, fica evidente o potencial de aplicação de extratos de folhas de oliveira no tratamento e recuperação de feridas, além do contexto regional de produção de matéria-prima, justificando o interesse de sua incorporação a diferentes formulações para essa finalidade.

3.4 Incorporação de bioativos naturais a curativos biopoliméricos

A incorporação de compostos naturais a estruturas biopoliméricas para obtenção de materiais com propriedades ativas tem embasamento científico já descrito na literatura. O Quadro 4 lista alguns trabalhos cujo objetivo foi essa incorporação a fim de obter materiais com propriedades para aplicação como curativos.

Quadro 4 - Incorporação de compostos naturais a biopolímeros para aplicação em tratamento de feridas.

Autores	Biopolímeros/ solvente/ plastificante	Aditivo natural	Resultados obtidos
Anjos (2017)	Quitosana / ácido acético 2,0 %/ sem adição de plastificante	Extrato hidroalcoólico de erva Santa Maria (<i>Chenopodium ambrosioides</i>).	Membranas contínuas, homogêneas e flexíveis, não citotóxicas para os testes realizados, com potencial de uso como biomaterial.
Alves (2018)	Gelatina / propilenoglicol	Extratos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> e <i>Abarema cochliacarpus</i> , ambas popularmente conhecidas como barbatimão.	Membranas contínuas, homogêneas, flexíveis, com potencial de promoção de cicatrização de feridas abertas, em modelo murinho.
Santos (2018)	Quitosana / ácido láctico 1,0 %/ sem adição de plastificante	Óleo de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>), óleo de melaleuca, e pós de polpa de caju (<i>Anacardium occidentale</i>) e polpa do fruto de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	Membranas transparentes, flexíveis, resistente mecanicamente e hidrofílicas; propriedades antimicrobianas com diferentes espectros de ação para <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> . Potencial de aplicação como curativos.
Yu <i>et al.</i> (2018)	Quitosana; colágeno; organomontmorilonita/ ácido acético 0,01 mol.L ⁻¹ / sem adição de plastificante	Pó de folhas de calicarpa-chinesa (<i>Callicarpa nudiflora</i>)	Membranas biocompatíveis, com capacidade antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> e potencial de aplicação como curativo.
Bueno (2019)	Alginato de sódio; quitosana / solução CaCl ₂ ; ácido acético/ glicerol; glicerol.	Extrato de flores de jambu (<i>Acmella oleacea</i>)	Extratos com propriedades inibidoras contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> e filmes incorporados do extrato com potencial de aplicação como curativo antimicrobiano e filme ativo com efeito botox para aplicações cosméticas.
Picolotto <i>et al.</i> (2019)	Celulose bacteriana / sem adição de plastificante.	Extrato de própolis vermelho	Membranas que aceleram o processo de cicatrização de feridas, com potencial de aplicação no tratamento de feridas crônicas.

Fonte: Autor (2022).

Anjos (2017) produziu membranas de quitosana incorporadas com extrato hidroalcoólico de erva Santa Maria para aplicação como biomaterial cicatrizante. Além disso, caracterizou as membranas por FTIR, MEV, TGA, DSC, absorção em água e molhabilidade e avaliou sua citotoxicidade *in vitro* sobre macrófagos murinos e eritrócitos de carneiro, para os quais as membranas não apresentaram citotoxicidade. Concluiu que as membranas obtidas apresentaram-se satisfatórias para aplicação como curativo cicatrizante dérmico. Em relação ao aspecto das membranas de quitosana pura e com adição de extratos, a Figura 3 mostra os resultados que obtiveram e pode-se observar principalmente a diferença na cor da matriz polimérica que muda e se acentua com o aumento da porcentagem adicionada de extrato, embora o aspecto de homogeneidade da estrutura se estenda a todas as composições.

Figura 3 – Membranas de quitosana: a) pura; b) com adição de 0,5 % de extrato; c) com adição de 1,0 % de extrato.



Fonte: Adaptada de Anjos (2017).

Alves (2018) avaliou o efeito cicatrizante de membranas de gelatina contendo extratos de duas diferentes espécies de plantas conhecidas como barbatimão. Caracterizou as membranas obtidas, com ou sem adição de extrato, quanto às suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, índice de intumescimento, colorimetria, MEV, FTIR e TGA e avaliou a atividade cicatrizante utilizando as membranas em feridas abertas de ratos *Wistar*, determinando o índice de retração da ferida e avaliando o processo inflamatório. As membranas adicionadas de extratos apresentaram elevados índices de retração das feridas quando comparadas às membranas puras, promovendo aceleração das etapas de cicatrização e potencial de aplicação como curativos.

Santos (2018) produziu membranas de quitosana, pelo método de *casting*, aditivadas com os compostos bioativos: óleos de cravo-da-índia e melaleuca, suco de caju e polpa de noni, bem como pós de caju e do fruto de noni atomizados. Caracterizou-as quanto à espessura, molhabilidade, grau de intumescimento, FTIR, MEV e ensaios de tração. Caracterizou as emulsões quitosana/bioativos quanto à atividade antimicrobiana por difusão em ágar. As membranas obtidas apresentaram propriedades antimicrobianas com diferentes espectros de ação, além de

apresentarem aderência e possibilidade de manuseio compatíveis para aplicação como curativos. Destacaram-se os resultados das membranas aditivadas com os óleos de cravo e melaleuca que apresentaram as melhores atividades antimicrobianas nas emulsões, tornando-as favoráveis à cicatrização de lesões cutâneas.

Yu *et al.* (2018) produziram membranas de quitosana-colágeno-organomontmorilonita e aditivaram-nas com extrato da planta calicarpa-chinesa, objetivando propriedades antibacterianas. Caracterizaram-nas utilizando DRX, TGA, MEV, grau de intumescimento, degradação *in vitro*, PVA e atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Seus resultados indicaram que a adição do extrato incrementou a atividade antimicrobiana das membranas em relação às composições sem extrato, resultando em uma membrana com excepcional potencial de aplicação como curativo.

Bueno (2019) desenvolveu filmes funcionais a base de alginato de sódio e quitosana, incorporando extrato de flores de jambu, para aplicação como curativos antimicrobianos e como cosmético anti-idade. Avaliou os filmes quanto à sua estrutura, espessura, teor de umidade, solubilidade, grau de intumescimento e atividade antibacteriana. Concluiu que os filmes de alginato mostraram os melhores resultados de conteúdo de umidade, solubilidade e grau de intumescimento e, especialmente os aditivados com maior concentração de extrato, apresentaram a melhor atividade antimicrobiana, com potencial de aplicação como curativo antimicrobiano.

Picolotto *et al.* (2019) adicionaram extrato de própolis vermelho a membranas de celulose bacteriana. Aplicaram as membranas aditivadas sobre lesões cirúrgicas em ratos com diabetes induzido. Seus resultados mostraram que as membranas associadas com o extrato de própolis aceleraram o processo de cicatrização, reduzindo o tamanho da lesão, favorecendo a reepitelização e controlando os níveis de inflamação. Assim, os grupos de ratos tratados com a membrana aditivada apresentaram maior capacidade de recuperação comparada com os grupos controle, indicando que o material produzido é apto a acelerar o processo de cicatrização e tem potencial de aplicação como curativo.

Considerando o suporte da literatura anteriormente descrito, justifica-se o interesse em desenvolver uma estrutura biopolimérica com incorporação de um bioativo de origem natural, visando à obtenção de um material com potencial de aplicação como curativo ativo no tratamento e recuperação de feridas. Espera-se obter membranas que possuam propriedades físicas, químicas, mecânicas e de barreira que possibilitem sua aplicação sobre feridas e que, além disso, apresentem propriedades ativas tais como antimicrobianas e antioxidantes que favoreçam sua recuperação e cicatrização.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos extratos de folhas de oliveira

Folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) do cultivar Arbequina foram coletadas diretamente das plantas da Estância Guarda Velha, localizada em Pinheiro Machado, Rio Grande do Sul (31°30'04.0"S, 53°30'42.0"O), em março de 2021, tratadas e processadas conforme Martiny; Rosa e Dotto, (2021) e descrito a seguir.

As folhas coletadas passaram por um pré-tratamento em que foram higienizadas com água corrente, solução comercial de hipoclorito de sódio 2% a 2,5% e água destilada esterilizada. Em seguida as folhas foram secas em estufa (ETHIK, Brasil) a 40°C por 24 h.

Após secagem, as folhas foram submetidas a moagem em moinho analítico de bancada (IKA® – A11BS32, China), obtendo-se dessa forma um pó das folhas. O pó obtido foi submetido a peneiramento para padronização granulométrica das partículas, utilizando-se a fração passante em peneira de 60 *mesh*, fabricada no padrão ABNT/ASTM/TYLER (BERTEL INDÚSTRIA METALÚRGICA LTDA., Brasil), garantindo partículas com diâmetro inferior a 0,272 mm.

Os extratos de folhas de oliveira foram obtidos pelo método da maceração, nas condições otimizadas por Martiny; Rosa e Dotto, (2021), adaptando-se o processo de filtragem dos extratos. Assim, 1,0 g do pó de folhas de oliveira foram macerados em 50,0 mL de água destilada e esterilizada, por um período de 2 h com agitação à temperatura de 88,2 °C. As extrações foram realizadas em *ernlenmeyers* cobertos com papel alumínio – para evitar contato do sistema extrator com a luz – e dispostos em banho *Dubnoff* (QUIMIS, Brasil) com controle de temperatura e agitação. Os extratos obtidos foram filtrados à vácuo em papel filtro (80 g/m² e porosidade de 3 µm), antes de sua aplicação em soluções filmogênicas. Conforme Martiny; Rosa e Dotto, (2021), nessas condições os extratos obtidos devem apresentar atividade antioxidante igual a 100% e compostos fenólicos totais iguais a 105,4 mg_{GAE}.g⁻¹ (b.s).

4.3 Obtenção e caracterização das membranas biopoliméricas

As membranas foram elaboradas utilizando quitosana (OAKWOOD CHEMICAL) com massa molar 170,7 – 198,5 kDa e grau de desacetilação de 95,0 % - conforme dados do fabricante – e glicerol (PRINCÍPIO ATIVO).

Para obtenção das membranas de quitosana pura (MQP) foi utilizada a metodologia de evaporação de solvente, ou *casting*, adaptada em relação às metodologias utilizadas por Anjos,

(2017) e Bueno, (2019). As soluções filmogênicas foram preparadas pela solubilização em solução de ácido acético 1% (m/m) de 1% de quitosana em relação ao volume de solvente. A quitosana foi adicionada à solução de ácido acético e mantida em repouso por 24 h, para solubilização do pó. Para padronização, a solubilização do pó foi feita em solução ácida correspondente a 50% do volume de solução final desejado. Após a solubilização, às soluções obtidas foram adicionados água destilada correspondente aos 50% de volume de solução final desejado, 20% de glicerol em relação à massa de quitosana e procedeu-se a agitação em agitador mecânico de pás (IKA®, Alemanha), por 10 min a 50 rpm. As soluções com glicerol tiveram seus pH's medidos e ajustados até pH = 5,0, pela adição de solução de hidróxido de sódio 2,0 mol. L⁻¹, e foram vertidas em placas de acrílico de 90 mm de diâmetro – 50 g em cada placa – e levadas a estufa com circulação forçada de ar a 40 °C, por 24 h, de forma a evaporar o solvente.

Após evaporação do solvente, as membranas obtidas foram armazenadas em dessecador com umidade relativa controlada de 50 % – por meio de solução de ácido sulfúrico – por no mínimo 48 h, antes de serem removidas das placas e submetidas a análises de suas propriedades mecânicas e de barreira.

As membranas de quitosana aditivadas de extratos de folhas de oliveira (MQE) foram obtidas pela adição de 50% de extrato em relação ao volume de solução filmogênica final desejado. Esse percentual foi definido através de ensaios preliminares. Para tanto, foi seguida a mesma metodologia anteriormente descrita e o extrato líquido foi adicionado em substituição à água destilada após a formação da solução filmogênica inicial. Os passos seguintes de secagem, armazenamento e análises das propriedades das membranas aditivadas foram os mesmos utilizados para a MQP.

4.3.3 Caracterização das membranas biopoliméricas

4.3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e aspecto visual

A fim de observar a morfologia das membranas obtidas, elas foram submetidas a análises em microscópio eletrônico de varredura (CARL ZEISS - EVO MA10, Estados Unidos). As amostras foram analisadas a uma voltagem de aceleração de 5 kV até uma magnificação de 1000 vezes.

As membranas também foram avaliadas quanto a seus aspectos visual (homogeneidade e cor) e tátil (textura ao toque e maleabilidade).

4.3.3.2 Espessura – (E)

A espessura (E) das membranas foi obtida em adaptação à metodologia aplicada por Bueno (2019), e Martiny *et al.* (2020a), para medidas da espessura de filmes de quitosana e carragenana, respectivamente. Foram tomadas 3 medidas aleatórias de espessura, sobre área fixa das membranas, utilizando-se micrômetro digital e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão dessas medidas.

4.3.3.3 Ensaio mecânicos – (T) e (E%)

As propriedades mecânicas das membranas foram obtidas de acordo com a norma D882-12, ASTM (2012). Assim, foram cortados corpos de prova retangulares de 2,5 x 10 cm das membranas obtidas que, então, foram submetidos a análises de tensão utilizando texturômetro (TA.XT plus - Texture Analyser; Reino Unido) e célula de carga de 50 N. Foi fixada uma distância inicial entre as garras do equipamento de 50 mm e uma velocidade de afastamento entre elas de 50 mm.min⁻¹. Estas análises foram feitas em trélicas para cada formulação estudada, na temperatura de 23 \pm 2 °C.

A resistência à tração (T) e a porcentagem de alongamento na ruptura (E%) foram determinadas pelas Equações 4 e 5.

$$T = \frac{F_m}{A} \quad (4)$$

$$E_{\%} = \left(\frac{d_r}{d_i} \right) \times 100 \quad (5)$$

em que T é a tensão obtida em resposta à tração (MPa), F_m é a força máxima medida na ruptura do filme (N), A a área da seção transversal do filme (m²), $E_{\%}$ o alongamento do material, d_r a distância na ruptura percorrida pela garra móvel (cm) e d_i o afastamento inicial entre as garras (cm).

4.3.3.4 Propriedades de barreira – (TVA) e (PVA)

A taxa de transmissão de vapor de água (TVA) e a permeabilidade ao vapor de água (PVA) das membranas, com ou sem adição de extrato de folhas de oliveira, foi determinada

segundo o Método Dessecante E96/E96-M descrito pela norma ASTM (2015), com modificação. Neste método gravimétrico, amostras de cada membrana devem ser cortadas em forma de discos de 50 mm de diâmetro e fixadas em células de permeação, de material não corrosivo e impermeável a água ou vapor de água, contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) granulado – 0 % UR após secagem a 200 °C. As células são então acondicionadas em dessecadores a 23 °C e 50 % de umidade relativa. Mensura-se o ganho de massa do cloreto de cálcio após 7 dias.

A taxa de transmissão de vapor de água pode ser quantificada pela Equação 6 e a permeabilidade ao vapor de água das membranas pode ser quantificada por meio da Equação 7:

$$TVA = \frac{m_{ab}}{t \cdot A} \quad (6)$$

$$PVA = \frac{m_{ab}}{t} \frac{E}{A \Delta P} \quad (7)$$

em que TVA é a taxa de transmissão de vapor de água ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$), PVA é a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), m_{ab} a massa de umidade absorvida (g), t o tempo total do teste (dias), E a espessura do filme (mm), A área da superfície exposta do filme (m^2) e ΔP a diferença de pressão parcial através do filme (kPa).

4.3.3.5 Intumescimento – (I)

A capacidade de intumescimento (absorção de água) das membranas foi obtida conforme Contessa (2020) cortando corpos de prova de 2,5 x 2,5 cm das membranas, pesando-os e imergindo-os, em seguida, 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. Realizou-se séries de 3 medições para cada composição, tomando como resultados suas médias. A quantidade de água absorvida foi calculada por meio da Equação 7:

$$I = \left(\frac{m_f - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (7)$$

em que 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 removido o excesso de água.

4.3.3.6 Solubilidade em água das membranas – (S)

A solubilidade em água das membranas foi obtida conforme metodologia empregada por Contessa (2020). Foram cortadas amostras de 2,5 cm de diâmetro das membranas e medidas sua massa seca inicial, secando-as em estufa a 105 °C por 24 h e, em seguida, pesando-as. Então, as amostras foram imersas em 50 mL de água destilada e submetidas a agitação orbital a 175 rpm por 24 h à temperatura de 25 °C. Após esse período, as amostras foram secas novamente em estufa a 105 °C por 24 h para determinação da massa seca final das membranas. A solubilidade foi determinada, então, por meio da Equação 8:

$$S = \left(\frac{m_{si} - m_{sf}}{m_{si}} \right) \times 100 \quad (7)$$

em que S é a solubilidade em água em %, m_{si} é a massa seca da membrana antes da imersão em água e m_{sf} a massa seca da membrana após imersão em água.

4.3.3.7 Atividade antimicrobiana das membranas – (A_{am})

A atividade antimicrobiana das membranas obtidas sem adição (controle) e com adição de extrato de folhas de oliveira foi testada contra os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus*, adaptando-se o método utilizado por Genevro, (2017).

As membranas foram previamente cortadas em forma circular com 0,65 cm de diâmetro e esterilizadas aplicando-se luz UV, por 15 minutos. Em placas de Petri foram adicionados 15 mL de ágar Mueller Hinton inoculados com 10^4 UFC/cm² de um ou outro micro-organismo testado. As amostras das membranas previamente preparadas foram, então, dispostas sobre o meio de cultura inoculado e incubadas por 24 h a 35 °C. Após incubação, foram efetuadas as determinações dos halos de inibição formados pelas amostras para cada micro-organismo testado, utilizando-se paquímetro digital.

4.3.3.8 Permeação microbiana das membranas

A capacidade das membranas em prevenir a penetração microbiana pode ser medida pela permeação microbiana e foi avaliada de acordo com a metodologia utilizada por Genevro, (2017), com adaptações.

Em frascos de vidro esterilizados foram adicionados 15 mL de meio BHI estéril. Amostras das membranas foram acopladas às bocas dos frascos e ajustadas com auxílio de elásticos, para vedá-los.

Como controle negativo, foi utilizado filme de PVC e tampa para fechar a área de permeação do frasco. Como controle positivo, não foi efetuada vedação do frasco com o meio de cultivo.

Os aparatos ficaram expostos por 5 dias em condições ambientes e foi avaliada macroscopicamente a turvação do meio no interior dos frascos como indicativo de contaminação por micro-organismos. Adicionalmente, foi realizada análise de absorvância, em espectrofotômetro, dos meios de cultivo em cada frasco nos tempos determinados de análise.

4.4 Análises estatísticas

Todos os dados coletados neste trabalho foram apresentados como média \pm desvio médio e analisados estatisticamente pelo *teste t*, com um nível de confiança de 95%, empregando-se o *Software Statistica 7.1*.

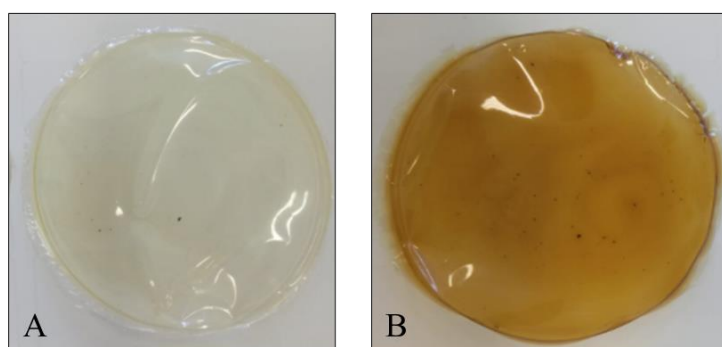
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das membranas

5.1.1 Aspecto visual e Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 4 apresenta fotos das MQP e MQE obtidas e a Figura 5 as imagens geradas por MEV para as mesmas.

Figura 4 – Aspecto visual das MQP e MQE.

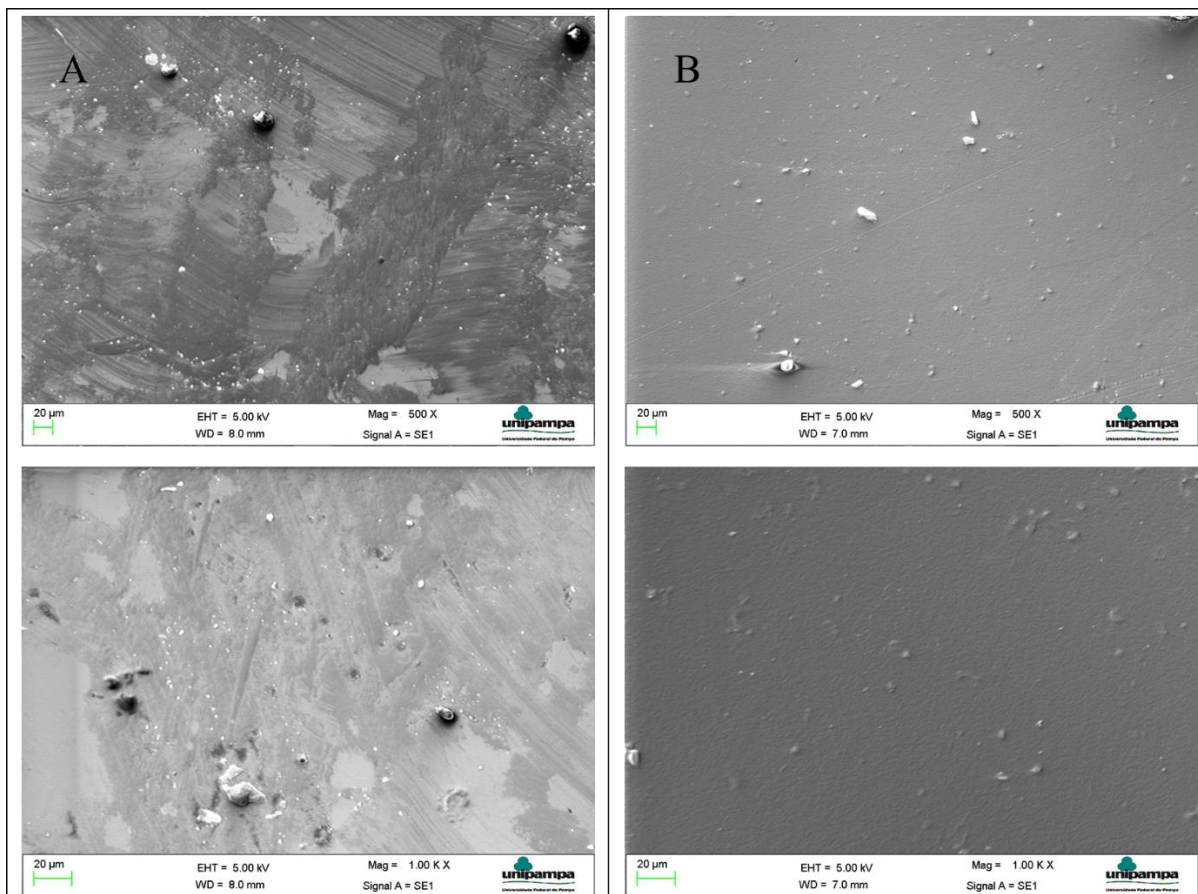


A) MQP; B) MQE.
Fonte: Autor (2022).

Da Figura 4 pode-se observar que a MQP apresentou uma cor esbranquiçada e aspecto brilhante, enquanto a MQE apresentou uma cor marrom-esverdeada, característica dos extratos de folhas de oliveira, e aspecto também brilhante. Ambas as membranas apresentaram-se íntegras quando removidas dos moldes mas pode-se observar principalmente na MQE que a matriz apresenta tonalidade mais escura em algumas áreas, indicando que pode ter havido durante o processo de secagem uma deposição preferencial de material sólido devido a desníveis na estufa e à circulação forçada de ar.

Os pontos pretos nas membranas, mais visíveis na MQE, verificou-se que são oriundos de materiais sólidos presentes na estufa de secagem e arrastados pela circulação forçada de ar, que se depositaram sobre a matriz. Quanto à maleabilidade, ambas as membranas apresentaram-se maleáveis e resistentes à manipulação, com sensação plástica e emborrachada ao toque.

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as membranas MQP e MQE.



As letras A e B representam as imagens de MEV para a MQP e MQE, respectivamente.

Fonte: Autor (2022).

A partir da Figura 5 pode-se observar que a MQP apresentou superfície heterogênea, com presença de aglomerados dispersos na matriz, mas contínua, sem fissuras ou poros. Santos (2018) encontrou para membranas de quitosana solubilizada em ácido láctico uma matriz homogênea, porém com presença de fissuras (atribuídas pela autora à influência do solvente utilizado). Guimarães (2018) também encontrou para hidrogéis de quitosana solubilizada em ácido acético a presença de aglomerados na matriz, que atribuiu a possíveis impurezas provenientes do polímero. Anjos (2017) encontrou em seus resultados de MEV para membranas de quitosana solubilizada em ácido acético 2% uma superfície densa, sem fissuras ou poros.

Para a MQE, pode-se observar uma superfície mais lisa e mais homogênea. Anjos (2017) verificou em seus resultados de MEV para membranas de quitosana pura e incorporadas com extrato de *C. ambrosioides* que o aumento da porcentagem de extrato adicionada às

composições resultou na formação de matrizes mais densas e homogêneas, embora com formação de bolhas.

5.1.2 Espessura e ensaios mecânicos – (E), (T) e (E%)

A Tabela 1 apresenta os resultados para espessura, tensão na ruptura e alongamento na ruptura para as membranas obtidas neste trabalho.

Tabela 1 - Resultados de espessura, tensão na ruptura (T) e alongamento (E%) das membranas de quitosana pura e aditivada com extrato de folhas de oliveira.

Composição	Espessura (mm)	T (MPa)	E% (%)
MQP	0,032 ± 0,009 ^a	8,92 ± 2,07 ^a	30,89 ± 4,30 ^a
MQE	0,040 ± 0,017 ^a	4,44 ± 0,05 ^b	31,53 ± 1,67 ^a

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste t.

Fonte: Autor (2022).

Da Tabela 1 pode-se observar que a espessura da membrana aditiva com EFO apresentou uma tendência de aumento em relação à espessura da MQP, embora não haja diferença estatística significativa entre os resultados para ambas as composições. Isto pode ser devido à presença de sólidos no extrato, implicando em um aumento de massa da solução e, consequentemente, da espessura da membrana (SOBRAL, 2000).

A espessura de substitutos cutâneos já em utilização para aplicação na recuperação de feridas é variável. Pode-se encontrar substitutos como a matriz dérmica MATRIDERM[®] (composta principalmente de colágeno e elastina) cuja espessura varia entre 1 e 2 mm bem como o substituto Integra[®] (matriz composta de colágeno bovino e condroitina-6-sulfato, coberta com uma fina camada de silastic) com espessura de 0,1 mm (BURKE et al., 1981; FERREIRA et al., 2011; NERY et al., 2011). Considerando-se essa distribuição ampla de espessuras de curativos comerciais acredita-se que, desde que apresentem outras propriedades importantes – como resistência mecânica e propriedades de barreira – as membranas obtidas neste trabalho apresentam potencial de aplicação no tratamento de feridas.

A partir da Tabela 1 verifica-se que os resultados para tensão na ruptura e alongamento das MQP foram de 8,92 ± 2,07 MPa e 30,89 ± 4,30 %, respectivamente. Dallan (2005) para membranas de quitosana pura adicionadas de glicerol obteve resultado de tensão na ruptura de 6,07 ± 1,63 MPa, muito semelhante ao aqui encontrado. Contudo, seu resultado de alongamento

na ruptura para a mesma composição foi de $177,1 \pm 26,31$ %, maior do que o encontrado neste trabalho.

De acordo com Guimarães et al. (2009), diversos parâmetros de processo como pH da solução, solvente e perfil de evaporação do solvente, utilização de plastificante, grau de desacetilação da quitosana, podem influenciar as propriedades mecânicas gerais dos materiais obtidos. Assim, acredita-se que as diferenças entre os resultados da Tabela 2 e do trabalho de Dallan (2005) devam-se principalmente às propriedades químicas das quitosanas utilizadas em cada caso e às diferentes proporções mássicas de polímero e plastificante empregadas por ela (2,5% e 0,5 % em relação à massa de solução, respectivamente) em relação às deste trabalho (1,0% e 0,2%, respectivamente).

Santos (2018) ao adicionar compostos bioativos em suas composições de quitosana solubilizada em ácido lático para aplicação no tratamento de lesões cutâneas verificou que a adição dos compostos resultou em uma diminuição na tensão máxima na ruptura das membranas em relação à membrana de quitosana pura ($20,29 \pm 4,53$ MPa). Este mesmo comportamento pode ser verificado para a MQE ($4,44 \pm 0,05$ MPa) em relação à MQP, mostrados na Tabela 1.

Para o alongamento, o comportamento dos materiais obtidos por Santos (2018) variou conforme o bioativo adicionado, aumentando em alguns casos e diminuindo em outros. Da Tabela não se observa para este parâmetro uma diferença estatística significativa entre as MQP e MQE, mas pode-se observar uma tendência de aumento do alongamento na ruptura para a MQE em relação à MQP.

De acordo com Rojas (2010), o extrato de folhas de oliveira adicionado à matriz polimérica pode exercer efeito plastificante, aumentando sua elasticidade, fazendo diminuir a tensão e aumentar a porcentagem de alongamento na ruptura, corroborando os resultados observados para estas propriedades na Tabela 1.

De acordo com Genevro (2017), um biomaterial deve possuir características mecânicas adequadas à sua aplicação e permitir fácil manuseio e armazenamento. Assim, para aplicações tópicas no tratamento de feridas, adotou-se como parâmetro de avaliação as características da pele humana que, segundo Silver (1994), são de 2,5 a 16 MPa para tensão na ruptura e de 70,0 % para elasticidade.

Considerando esses valores como parâmetro e os resultados de resistência à tração, ambas composições (MQP e MQE) foram consideradas adequadas para aplicação como curativos, uma vez que se encontram na faixa descrita. Quanto à porcentagem de alongação, nenhuma das composições apresentou tanta elasticidade quanto a pele, contudo, as membranas apresentaram-se resistentes ao manuseio e maleáveis, demonstrando potencial de aplicação.

5.1.4 Propriedades de barreira e absorção – (TVA), (PVA), (I) e (S)

A Tabela 2 exibe os resultados para taxa de transmissão de vapor de água, permeabilidade ao vapor de água, intumescimento e solubilidade das membranas obtidas.

Tabela 2 - Resultados de permeabilidade ao vapor de água, intumescimento e solubilidade das MQP e MQE.

Composição	TVA ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$)	PVA ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	Intumescimento (%)	Solubilidade (%)
MQP	$510,39 \pm 12,10^a$	$6,23 \pm 0,97^a$	$242,60 \pm 12,41^a$	$18,57 \pm 1,64^a$
MQE	$581,84 \pm 6,03^b$	$5,52 \pm 1,10^a$	$59,45 \pm 3,60^b$	$31,55 \pm 5,79^b$

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste t.

Fonte: Autor (2022).

De acordo com Ruiz-Cardona et al. (1996), um curativo deve ser capaz de evitar a desidratação excessiva, bem como o acúmulo de excesso de exsudato em feridas. Ainda, de acordo com eles, as taxas de transmissão de vapor de água variam de cerca de $200 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$, para pele normal, cerca de $270 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ para pele com queimaduras de primeiro grau e até $5000 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ para pele com formação de tecido de granulação. Ou seja, pode-se concluir que a aplicabilidade de um material para proteção de feridas é dependente do tipo de ferida que se deseja tratar.

Dos resultados de TVA da Tabela 2, pode-se observar que a MQE apresentou maior taxa de transmissão de vapor que a MQP, o que pode ser devido às propriedades do extrato incorporado à matriz. Também, conclui-se que para aplicações na proteção de feridas como queimaduras de primeiro grau, por exemplo, ambas as composições apresentaram resultados adequados, embora para outras aplicações essa viabilidade deva ser avaliada.

Da Tabela 2, verifica-se que não houve diferença estatística significativa para os resultados de PVA da membrana aditivada com extrato de folhas de oliveira em relação à MQP. Pereira (2019) preparou filmes bioativos para aplicação em alimentos com 1,0 % de quitosana (m/v) solubilizada em ácido acético, adicionando 30,0% (m/m_{quitosana}) de glicerol, e incorporando extrato de bagaço de oliveira em suas composições e verificou um aumento de 28 % na permeabilidade ao vapor de água do filme adicionado com o extrato em relação ao filme de quitosana pura.

O fato de não se verificar um aumento nos resultados da MQE em relação à MQP exibidos na Tabela 2, como no trabalho de Pereira (2019), pode ser devido tanto as propriedades

físico-químicas das quitosanas e dos extratos utilizados nos dois trabalhos como às quantidade de glicerol utilizada e morfologia dos filmes e membranas obtidos. Isto justifica-se pois, de acordo com Martins; Cerqueira e Vicente (2012), espessura, sensibilidade à água, estrutura química e morfologia podem afetar os resultados de PVA de composições de quitosana.

Em relação aos resultados de intumescimento apresentados na Tabela 2, verifica-se que houve uma diminuição da capacidade de absorção de água da MQE em relação à MQP. Santos (2018) verificou que ao incorporar diferentes compostos bioativos às composições de suas membranas de quitosana, de maneira geral, quanto maior a concentração de bioativos adicionada, menor foi o poder de intumescimento exibido pelas membranas.

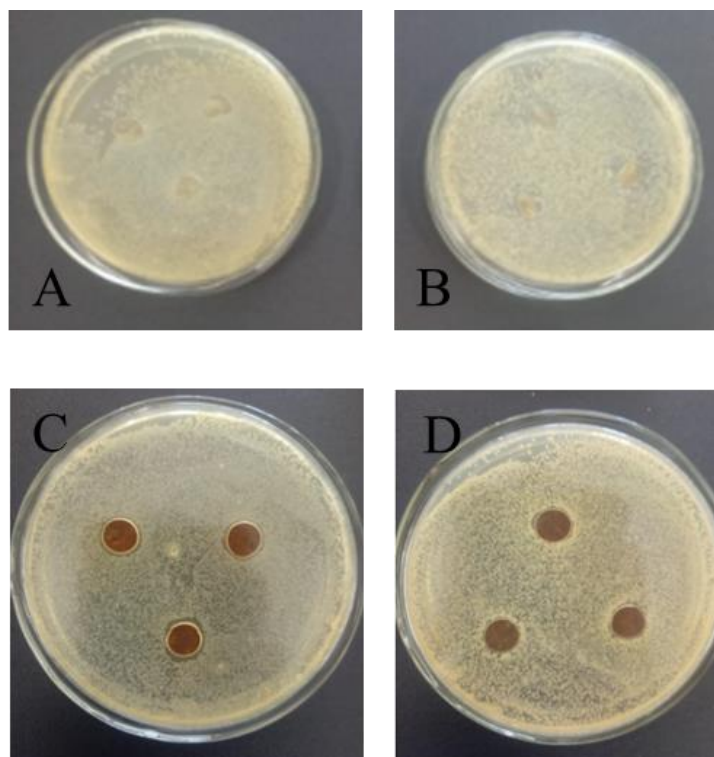
De acordo com Morgado et al. (2017), a capacidade de intumescimento de um curativo ideal deve ser de 100 % a 900 % e é decisiva para uma apropriada difusão de nutrientes e células no tratamento de lesões. Considerando os resultados encontrados neste trabalho e tendo como referência os valores descritos por Morgado et al. (2017), a MQE não se apresentou apropriada para aplicação como curativo do ponto de vista da capacidade de intumescimento.

Em relação à solubilidade em água, por meio da Tabela 2, pode-se verificar que houve um aumento da solubilidade da MQE em relação à MQP, indicando uma maior afinidade da membrana aditivada com extrato com água. De acordo com Contessa (2021), isso pode ser devido a propriedades hidrofílicas dos bioativos (presentes no extrato) adicionados à matriz polimérica da MQE. Do ponto de vista da aplicação como curativos, essa maior solubilidade da MQE pode ser um desafio, uma vez que ela poderia solubilizar em contato com fluidos da ferida que se propõe tratar, reduzindo a efetividade da proteção conferida.

5.1.5 Atividade antimicrobiana das membranas e permeação microbiana

A Figura 6 apresenta fotografias das análises de atividade antimicrobiana das membranas e a Tabela 3 os resultados dessas análises.

Figura 6 - Análises de atividade antimicrobiana das membranas.



As letras A e B apresentam as fotografias das análises de inibição microbiana das MQP para os micro-organismo *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. As letras C e D apresentam fotografias das mesmas análises para a MQE, para os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.
Fonte: Autor (2022).

Tabela 3 - Resultados de inibição microbiana das membranas.

Composição	Inibição contra <i>S. aureus</i> (mm)	Inibição contra <i>E. coli</i> (mm)
MQP	0,00	0,00
MQE	9,15 ± 0,82	9,91 ± 1,30

Fonte: Autor (2022).

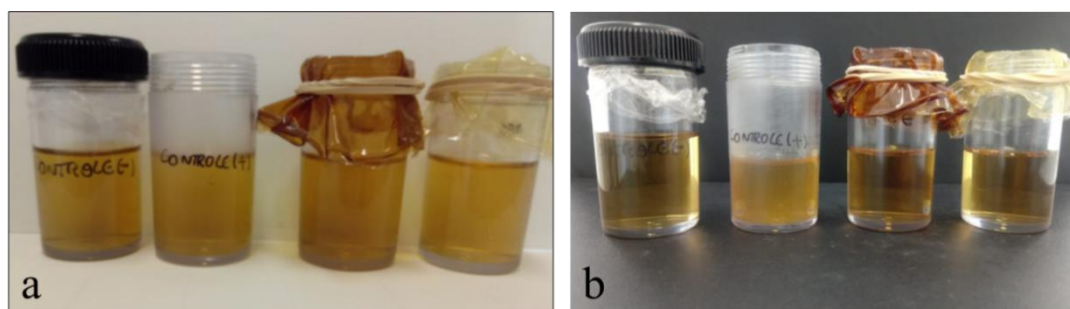
Observa-se da Figura 6 e da Tabela 3 que houve uma diferença notável na inibição da MQE em relação à MQP, para ambos os micro-organismos testados. Isto indica que a MQE tem um bom potencial de inibição tanto para micro-organismos Gram-positivos como para micro-organismos Gram-negativos e um potencial de aplicação na recuperação de feridas.

Ma et al. (2017), prepararam membranas de quitosana plastificadas com glicerol e incorporaram em suas composições os medicamentos cloridrato de tetraciclina (TH) e sulfadiazina de prata (AgSD), para fins de incremento da atividade antibacteriana na recuperação de feridas. Suas análises de inibição contra *E. coli* e *S. aureus* para as membranas de quitosana pura e aditivadas foram bastante semelhantes aos aqui encontrados. Verificaram que a membrana de

quitosana pura não apresentou halos de inibição nos ensaios, enquanto as membranas aditivadas com cloridrato de tetraciclina e sulfadiazina de prata apresentaram halos de inibição contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, de 7,04 mm e 10,6 mm para o cloridrato de tetraciclina e de 5,32 mm e 3,52 mm para a sulfadiazina de prata.

A Figura 7 apresenta fotos do aparato das análises de permeação microbiana no tempo 0 e após 5 dias de análise.

Figura 7 - Aparato das análises de permeação microbiana: a) 0 dias, b) 5 dias.



Fonte: Autor (2022).

A Tabela 4 apresenta os resultados de absorvância dos meios de cultivo para as análises de permeação microbiana.

Tabela 4 - Resultados de absorvância para análises de permeação microbiana.

Amostra	Absorbância (0 dias)	Absorbância (5 dias)
Controle (-)	0,040	0,040
Controle (+)	0,040	0,400
MQP	0,040	0,040
MQE	0,040	0,042

Fonte: Autor (2022).

Da Figura 7 e da Tabela 4, observa-se que no 5º dia de análise, houve um grande aumento da turbidez do sistema de controle (+), resultando em um aumento da absorvância medida, enquanto para os sistemas de controle (-) e revestido com a MQP não houve alteração da turbidez do meio. Para o sistema revestido com a MQE houve um aumento sutil da turbidez do meio no 5º dia. Este aumento de turbidez está diretamente relacionado com o crescimento de micro-organismos nos meios de cultura sendo maior a turbidez quanto maior a presença de micro-organismos no meio.

Sendo assim, a MQP e a MQE apresentaram bom potencial de aplicação na proteção de feridas em termos de barreira à entrada de micro-organismos.

6 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que é possível a obtenção de extratos de origem natural utilizando-se solventes amigáveis ao meio ambiente, como a água, e com boas propriedades ativas para aplicação no tratamento de feridas.

Permitiu, também, a obtenção de membranas de quitosana aditivadas com extrato de folhas de oliveira e potencial de aplicação no tratamento de feridas.

A incorporação do extrato de folhas de oliveira às membranas de quitosana proporcionou a obtenção de membranas com uma matriz polimérica mais contínua e homogênea.

Considerando-se as propriedades mecânicas encontradas para as MQP e MQE obtidas, em relação à espessura e resistência à tração, ambas composições apresentaram potencial de aplicação no tratamento de feridas, embora os resultados de alongamento na ruptura encontrados não tenham atingido os valores desejáveis para essa finalidade.

Quanto às propriedades de barreira, concluiu-se que para taxa de transmissão de vapor de água e para a permeabilidade ao vapor de água, ambas as composições se apresentaram adequadas para aplicação no tratamento de feridas, com ressalvas para o tipo de ferida a ser tratado.

Os resultados para intumescimento e solubilidade das membranas, indicaram boa aplicabilidade da MQP no tratamento de feridas, enquanto a MQE apresentou resultados inferiores, indicando uma capacidade limitada de manter a integridade da matriz polimérica dependendo das características da ferida que se deseja tratar.

Em termos de inibição ao crescimento de micro-organismos, a MQP não apresentou inibição contra os micro-organismos avaliados (*E. coli* e *S. aureus*) enquanto a MQE destacou-se neste aspecto com resultados que indicaram boa capacidade de aplicação no tratamento de feridas. Os resultados de permeação microbiana foram tais que ambas as composições apresentaram capacidade de prover barreira à entrada de micro-organismos e, portanto, de serem aplicadas na proteção de feridas.

Por tudo isso, fica explícito o potencial do extrato de folhas de oliveira para incorporação a matrizes poliméricas com vista a aplicação como curativos no tratamento de feridas.

Para estudos futuros, é possível avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de extrato de folhas, bem como de outros extratos de origem natural, nas propriedades das membranas. Ainda, pode-se explorar a influência da porcentagem de adição do plastificante, glicerol, nessas propriedades e a combinação da quitosana com outros biopolímeros.

De forma geral, estender os estudos das propriedades das membranas obtidas a estudos *in vivo*, pode incrementar muito o entendimento de sua aplicabilidade na proteção e recuperação de feridas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. M. A. **Efeito cicatrizante de membranas contendo extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Abarema chochliacarpos* em feridas abertas em modelo animal**. Aracaju: Universidade Tiradentes, 2018. 135 p. Acesso em: 15 mar. 2021, 10:30.
- ANJOS, F. F. dos. **Preparo e caracterização de membranas de quitosana com incorporação do extrato hidroalcoólico liofilizado do *Chenopodium ambrosioides* para aplicação como biomaterial**. Teresina: IFPI, 2017. 74 p. Acesso em: 15 mar. 2021, 09:45.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, **Official methods of analysis**. 15. Ed. Washington D.C.: AOAC, 1990.
- ASTM. **Standard test methods for tensile properties on thin plastic sheeting**. Método: D 882. Philadelphia: Americam Society for Testing Materials, 2002. 10p.
- _____. **Standard methods of water vapor transmission of materials**. Método: E96/ E96M-05. Philadelphia: Americam Society for Testing Materials, 2005. 11 p.
- AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, 2013, v. 117, p. 426-436.
- BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2010, v. 56, p. 290-299. Acesso em: 14 dez. 2020, 18:35.
- BANO, I. *et al.* Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, v. 102, p. 380-383. Acesso em: 14 dez. 2020, 17:11.
- BEDI, M. K.; SHENEFELT, P. D. Herbal therapy in dermatology. **Arch. Dermatology**, 2002, v. 138, p. 232-242. Acesso em: 14 dez. 2020, 19:52.
- BENAVENTE-GARCÍA, O. *et al.* Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, 2000, v. 68, p. 457-462. Acesso em: 15 dez. 2020, 17:20.
- BOATENG, J. S. *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008, v. 97, n. 8, p. 2892-2923.
- BOUDHRIOUA, N. *et al.* Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. **Industrial Crops and Products**, 2009, v. 29, p. 412-419.
- BRASIL. Brasil Próximo. 2020. Disponível em: <http://www.brasilproximo.com/?page_id=19&lang=pt>. Acesso em: 15 dez. 2020, 18:40.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J.; ATTINGER, C. The basic Science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 2006, v. 117, p. 12-34. Acesso em: 12 dez. 2020, 15:23.
- BUENO, R. S. **Desenvolvimento de filmes funcionais incorporando extrato de *Acmella oleracea* para fins cosméticos e antimicrobiano**. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2019. 63 p. Acesso em 16 mar. 2021: 14:37.

BURKE, J. F et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Artificial Skin and Burn Injury**, , v. 194, p. 413-427. Acesso em 02 nov. 2021.

CONTESSA, C. R. **Bioplástico de quitosana/ágar-ágar incorporado com bacteriocina obtida de matriz alimentar para aplicação como embalagem ativa**. Bagé: Universidade Federal do Pampa, 2020, 57 p. Acesso em: 12 jul. 2021.

COUTINHO, E. F. *et al.* Introdução e importância econômica. In: COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H (Ed.). **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009, 125 p.

CROISIER, F; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterial for tissue engineering. **European Polymer Journal**, 2013, v. 49, p. 780-792. Acesso em: 09 de fev. 2021, 18:45.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005, 212 p. Acesso em 12 maio 2021.

DiGREGORIO, B. E. Biobased performance bioplastic: Mirel. **Chemistry & Biology**, 2009, v. 16. Acesso em: 14 dez. 2020, 10:34.

EAGLSTEIN, W. H; FALANGA, V. Chronic wounds. **Surgical Clinics of North America**, 1997, v. 77, n. 3, p. 689-700. Acesso em: 12 dez. 2020, 16:07.

ERDOGAN, I. *et al.* Wound healing effects of various fractions of olive leaf extract (OLE) on mouse fibroblasts. **Romenian Biotechnological Letter**, 2018, v. 23, n. 6, p. 14217-14218. Acesso em: 25 ago. 2021, 17:43.

FERREIRA, M. C. *et al.* Skin substitutes: current concepts and a new classification system. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, 2011, v. 26, n. 4, p. 696-702. Acesso em: 03 nov. 2021, 13:57.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Advances in wound care**, 2015, v. 4, n.9, p. 1-23. Acesso em: 15 jan. 2021, 14:37.

GENEVRO, G. M. **Desenvolvimento de materiais microestruturados a partir de biopolímeros para obtenção de curativos de alto desempenho**. Campinas:Unicamp, 2017. 110 p. Acesso em: 02 jan. 2021, 09:40.

GOMES, S.; MARTINS-LOPES, P.; GUEDES-PINTO, H. Olive tree genetic resources characterization through molecular markers. In: CALISKAN, M. (Ed.). **Genetic diversity in plants.**: InTech, 2012, p. 15-28. Acesso em: 15 dez. 2020, 15:03.

GUINDA, A.; PÉREZ-CAMINO, M.; LANZÓN, A. Supplementation of oil with oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea*). **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2004, v. 106, n. 1, p. 22-26. Acesso em: 15 dez. 2020, 14:36.

GUO, S.; DiPIETRO, L. Factors affecting wound healing. **Journal of Dentistry Research**, 2010, v. 89, p. 219-229. Acesso em: 12 dez. 2020, 18:42.

GUPTA, A.; NARANIWAL, M.; KOTHARI, V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. **Internationa Journal of Applied and Natural Sciences**, 2012, v. 1, p. 8-26. Acesso em: 14 dez. 2020, 20:13.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H. Biodegradable Polymers. In: CHAMY, R.; ROSENKRANZ, F. **Biodegradation - Life of Science**. Irã: INTECH, 2013. Cap. 6, p. 141-185. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/56230>>. Acesso em: 15 dez. 2020, 14:30.

GROSS, R.; KALRA, B. Biodegradable polymers for the environment. **Science**, 2002, v. 297, p. 803-807. Acesso em: 14 dez. 2020, 10:35.

GUIMARÃES, A. A. S. **Hidrogéis à base de quitosana/poli(álcool vinílico) para liberação de fármaco visando uso pontencial como curativo**. João pessoa: UFPB, 2018. 162 p. Acesso em 02 de nov. de 2021, 10:15.

IBRAHIM, N. *et al.* Wound healing properties of selected natural products. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2018, v. 15, p. 1-23. Acesso em 12 dez. 2020, 10:19.

INSTITUDO BRASILEIRO DE OLIVICULTURA (IBRAOLIVA). **Safra 2021 de oliveiras traz boas expectativas aos produtores**. Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.ibraoliva.com.br/noticias/detalhe/107/safra-2021-de-oliveiras-traz-boas-expectativas-aos-produtores>>. Acesso em: 04 mar. 2021, 14:30.

IRFAN-MAQSOOD, Muhammad. Classification of wounds: know before research and clinical practice. **Journal of Genes and Cells**, 2018, vol. 4, p. 1-4. Acesso em: 12 dez. 2020, 15:05.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; CASTRO, M. D. L. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, 2006, v. 1108, p. 76-82. Acesso em: 15 dez. 2020, 16:23.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, 2017, v. 8, p. 217-233. Acesso em: 03 mar. 2021, 11:27.

KORUKLUOGLU, M.; SAHAN, Y., YIGIT, A. Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. **Journal of Food Safety**, 2008, v. 28, p. 76-87. Acesso em: 05 de fev. 2021, 18:40.

KUMAR, S. L.; ANANDHAVELU, S.; SWATHY, M. Preparation and characterization of goat hoof keratin/gelatina/sodium alginate base biofilm for tissue engineering application. **Integrated Ferroelectrics**, 2019, v. 202, p. 1-12. Acesso em: 12 dez. 2020, 14:28.

KUMAR, S. S. D *et al.* Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer based biomaterials for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. Acesso em: 14 dez. 2020, 15:30.

LAMKE, L.-O.; NILSSON, G. E.; REITHNER, H. L. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. **Burns**, 1977, v. 3, n. 3, p. 159-165.

LAZARUS, G. *et al.* Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Wound repair and regeneration**, 1994, vol. 2, n. 3. Acesso em: 12 dez. 2020, 14:53.

LEE, O.; LEE, B. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea erupaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, 2010, v. 101, p. 3751-3754.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, 2007, vol. 25, p. 9-18. Acesso em: 12 dez. 2020, 15:30.

LIONELLI, G. T.; LAWRENCE, W. T. Wound dressings. **Surgical clinics of North America**, 2003, v. 83, p. 617-638. Acesso em 12 dez. 2020, 15:40.

MA, Y. *et al.* Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Materials Science & Engineering**, 2017, v. 81, p. 522-531. Acesso em 15 jul. 2022, 15:45.

MACHADO, M. F. F. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho na análise de clones de azeitonas e azeites cv. "Cobrançosa" em dois estados de maturação.** Vila Real, Portugal: UTAD, 2013. 61 p. Acesso em 19 jun. 2021, 13:56.

MADNI, A.; KOUSAR, R.; NAEEM, N.; WAHID, F. Recent advancements in applications of chitosan-based biomaterials for skin tissue engineering. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, 2021, v. 6, p. 11-25. Acesso em 15 jul. 2022, 14:30.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physico-chemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, 2012; v. 27, p. 220–227. Acesso em 15 maio 2021, 17:43.

MARTINY, T. R. *et al.* A novel biodegradable film based on k-carrageenan activated with olive leaves extract. **Food Sciences & Nutrition**, 2020a, v. 8, n. 7. Acesso em: 04 mar. 2021, 17:45.

MARTINY, T. R. *et al.* Bio-based active packaging: carrageenan film with olive leaf extract for lamb meat preservation. **Foods**, 2020b, v. 9. Acesso em: 04 mar. 2021, 17:50.

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**, 2021, v. 9. Acesso em: 05 mai. 2021, 15:42.

MARTINY, T. R.; ROSA, G. S.; DOTTO, G. L. Otimização da extração por maceração para recuperação de compostos bioativos da olivicultura. In: I Web Encontro Nacional de Engenharia Química, 2021. Anais do I Web Encontro Nacional de Engenharia Química, 2021.

MAVER, T. *et al.* A review of herbal medicines in wound healing. **International Journal of Dermatology**, 2015, p. 1-2. Acesso em 13 dez. 2020, 10:17.

MORGADO, P. I. *et al.* Ibuprofen loaded PVA/chitosan membranes: A highly eficiente strategy towards na improved skin wound healing. **Carbohydrate Polymers**, 2017, v. 159, p. 136-145. Acesso em: 03 nov. 2021, 10:52.

MUXICA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, v.105, p. 1358– 1368. Acesso em: 05 mar. 2021, 09:46.

NERY, A. L. V. et al. Nova abordagem no tratamento de lesões complexas: uso de matriz de regeneração dérmica. **Rev. Bras. Queimaduras**, 2011, v. 10, n.2, p. 66-70. Acesso em: 10 nov. 2021.

OLIVEIRA, M. C. **Enraizamento de estacas de oliveira submetidas à aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB**. Lavras: UFLA, 2009. 52 p.

PACETTA, C. F. **Estudo de diferentes metodologias para obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína**. Pirassununga: USP, 2013. 82 p. Acesso em: 03 mar. 2021, 10:34.

PATRULEA, V. *et al.* Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2015, v. 97, p. 417-426. Acesso em: 14 dez. 2020, 16:32.

PEREIRA, P. S. **Otimização da extração de compostos fenólicos provenientes do bagaço de oliveira (*Olea europaea* L.) para aplicação em biofilme ativo**. Bagé: Unipampa, 2019. 56 p.

PREFEITURA DE PINHEIRO MACHADO (PINHEIRO MACHADO/RS). Pinheiro Machado, 2017. Disponível em < <https://www.pinheimomachado.com.br/cultivo-de-oliveiras-em-pinheiro-machado/> >. Acesso em: 06 fev. 2020, 19:25.

PICOLOTTO, A. *et al.* Bacterial cellulose associated with red própolis as phytomodulator: improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacology**, 2019, v. 112. Acesso em: 16 mar. 2021, 15:38.

QABAHA, K. *et al.* Oleuropein is responsible for the major anti-inflammatory effects of olive leaf extract. **Journal of Medicinal Food**, 2017, v. 0, p. 1-4.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, 2006, v. 31, p. 603-632. Acesso em: 14 dez. 2020, 17:53.

ROBSON, M.; STEED, D. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current Problems in Surgery**, 2001, v. 38, n. 2, p. 71-141.

ROJAS, I. M. **Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas em zeína**. Pamplona: Universidad Pública de Navarra, 2010. Acesso em: 27 out. 2021, 09:32.

ROSA, G. S. *et al.* **Biofilmes antimicrobianos para proteção de alimentos**. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170133818, título: "Biofilmes antimicrobianos para proteção de alimentos". Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/06/2017

ROSA, G. S. *et al.* Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2019a, v. 58. Acesso em 04 mar. 2021, 18:50.

ROSA, G. S. *et al.* Development of biodegradable films with improved antioxidante properties based on the addition of carrageenan containing olive leaf extract for food packaging applications. **Journal of Polymers and the Environment**, 2019b, v. 28, p. 123-130. Acesso em 04 mar. 2021, 19:32.

ROSA, G. S. *et al.* Eco-friendly extraction for the recovery of bioactive compounds from Brazilian olive leaves. **Sustainable Material and Technologies**, 2021, v. 28, p. 1-6. Acesso em 05 mai. 2021, 14:37.

RUIZ-CARDONA, L. *et al.* Application of benzyl hyaluronate membranes as potential wound dressings: evaluation of water vapour and gas permeabilites. **Biomaterials**, 1996, v. 17, p. 1639-1643. Acesso em 23 de abr. 2022, 15:53.

SAHANA, T. G.; REKHA, P. D. Biopolymers: applications in wound healing and skin tissue engineering. **Molecular Biology Reports**, 2018. Acesso em: 14 dez. 2020, 17:35.

SAMANCIOĞLU, S. *et al.* A new dressing material in diabetic wounds: wound healing activity of oleuropein-rich olive leaf extract in diabetic rats. **Gaziantep Medical Journal**, 2016, v. 1, p. 14-21.

SANTOS, E. P. dos. **Membranas de quitosana/bioativos naturais com atividade antimicrobiana para tratamento de lesões cutâneas**. João Pessoa: UFPB, 2018. 138 p. Acesso em: 15 mar. 2021.

SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e IRRIGAÇÃO (SEAPI/RS). Porto Alegre, 2020. Disponível em: < <https://www.agricultura.rs.gov.br/olivicultura-em-debate> >. Acesso em: 05 fev. 2020, 17:32.

SHAH, S. A. *et al.* Biopolymer-based biomaterials for accelerated diabetic wound healing: a critical review. **International Journal of Biological Micromolecules**, 2019, v. 139, p. 775-993. Acesso em: 13 dez. 2020, 17:12.

SILVER, F. H. Wound dressings and skin replacement. In: **Biomaterials, Medical Devices and Tissue Engineerign: An Integrated Approach**. U.S.:1994, Chapman & Hall. Acesso em: 14 out. 2021, 11:19.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1965, v.16, p. 144-158.

SIVAMANI, R. K. *et al.* Phytochemicals and naturally derived substances for wound healing. **Advances in Wound Care**, 2012, v. 1, n. 5, p. 213-217. Acesso em: 14 dez. 2020, 18:30.

SMITH, A. M.; MOXON, S; MORRIS, G. A. Biopolymers as wound healing materials. **Wound Healing Biomaterials**, 2016, v. 2, p. 261-287. Acesso em: 13 dez. 2020, 13:42.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 2000, v. 35, n. 6, p. 1251-1259. Acesso em: 12 out. 2021, 14:10.

SUDJANA, A. N. *et al.* Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2009, v. 33, p. 461-463. Acesso em: 15 dez. 2020, 13:38.

SÜNTAR, I. *et al.* Wound healings and antioxidant properties: do they coexist in plants? **Free Radicals and Antioxidants**, 2012, v. 2, p. 1-7. Acesso em: 14 dez. 2020, 20:53.

THONPHO, A.; SRIHANAM, P. Preparation and Characterization of keratin blended films using biopolymers for drug controlled release application. **Oriental Journal of Chemistry**, 2016, v. 32, n. 4, p. 1739-1748. Acesso em 12 dez. 2020, 13:22.

UENO, H; MORI, T. FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001, v. 52, p. 105-115. Acesso em: 04 fev. 2021, 10:46.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, 2002, v. 21, p. 433-442. Acesso em 05 fev. 2021, 19:45.

VELNAR, T; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the celular and molecular mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, 2009, vol. 37, p. 1528 – 1542. Acesso em : 12 dez. 2020, 15:10.

VISHAKHA; S. K.; KISHOR; D. B.; SUDHA, S. R. Natural polymers – a comprehensive review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, 2012, v. 3, n. 4, p. 1597-1613. Acesso em: 13 dez. 2020, 13:15.

WAINSTEIN, J. *et al.* Olive leaf extracts as hypoglycemic agente in both human diabetic subjects and rats. **Journal of Medicinal Food**, 2012, v. 14, p. 605-610. Acesso em: 15 dez. 2020, 14:04.

WATERMAN, E.; LOCKWOOD, B. Active components and clinical applications of olive oil. **Alternative Medicine Review**, 2007, v. 12, n. 4, p. 331-342. Acesso em 15 dez. 2020, 13:19.

YILMAZ, E. Chitosan: a versatile biomaterial. In: **Biomaterial: From Molecules to Engineered Tissues**, 2004. Acesso em: 14 de dez. 2020, 18:15.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, 2015, v. 13, p. 1122-1174. Acesso em: 14 dez. 2020, 18:23.

YU, L; CHEN, L. Polymeric materials from renewable resources. In: **Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources**. 2009, cap. 1, p. 1-15. Acesso em 14 dez. 2020, 13:57.

YU, X. *et al.* *Callicarpa nudiflora* loaded on chitosan-collagen-organomontmorillonite composite membrane for antibacterial activity of wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. Acesso em: 15 mar. 2021, 12:45.

ZIELINS, E. R. *et al.* Wound healing: an update. **Regenerative Medicine**, 2014, v. 9, n. 6, p. 817-830. Acesso em: 15 jan. 2021, 15:43.