

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE FOLHAS DE OLIVEIRA: ABORDAGEM SUSTENTÁVEL PARA REUTILIZAR SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA OLEÍCOLA

Aline Rossato¹; Carolina Rapachi Fortes¹; Larissa da Silva Silveira¹; Luiz Fernando Rodrigues Junior³; Liana da Silva Fernandes²; Matheus Dellaméa Baldissera³; Michele Rorato Sagrillo²

RESUMO

Este estudo investigou a preparação de um extrato hidroalcoólico de folhas de oliveira (EFO), subproduto da indústria de azeite na região sul do Brasil, e explorou seu potencial bioativo. O EFO apresentou elevada concentração de compostos flavonoides e fenólicos, como rutina (110,14 mg/g de extrato), hidroxitirosol (8 mg/g) e oleuropeína (5,36 mg/g), reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. O extrato demonstrou eficácia na inibição e destruição de biofilmes formados por microrganismos patogênicos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, com concentrações inferiores a 30 mg/mL. Esses resultados sugerem que o EFO pode ser uma abordagem promissora para combater infecções bacterianas, ao mesmo tempo que promove a sustentabilidade ecológica e a economia circular ao reaproveitar subprodutos agroindustriais. O estudo destaca a importância de valorizar as folhas de oliveira pelo seu elevado conteúdo bioativo.

Palavras-chave: *Olea europaea* L; Subprodutos; Sustentabilidade; Atividade Antibiofilme; Microrganismos Patogênicos.

ABSTRACT

This study investigated the preparation of a hydroalcoholic extract from olive leaves (EFO), a by-product of the olive oil industry in southern Brazil, and explored its bioactive potential. The EFO showed a high concentration of flavonoid and phenolic compounds, such as rutin (110.14 mg/g of extract), hydroxytyrosol (8 mg/g), and oleuropein (5.36 mg/g), known for their antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties. The extract demonstrated effectiveness in inhibiting and destroying biofilms formed by pathogenic microorganisms, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Enterococcus faecalis*, and *Candida albicans*, with concentrations below 30 mg/mL. These results suggest that EFO may be a promising approach to combating bacterial infections, while

¹ Alunas de Doutorado no Programa de pós-Graduação em Nanociências – Universidade Franciscana, RS.

² Professores adjuntos no Programa de Pós - Graduação em Nanociências – Universidade Franciscana, RS.

³ Professor adjunto na Universidade Franciscana, RS.

promoting ecological sustainability and the circular economy by reusing agro-industrial by-products. The study highlights the importance of valuing olive leaves for their high bioactive content.

Keywords: *Olea europaea* L; By-products; Sustainability; Antibiofilm Activity; Pathogenic Microorganisms.

Eixo Temático: Tecnologia, Inovação e Desenvolvimento Sustentável.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil é notável por sua vasta riqueza ambiental, possuindo seis biomas distintos que oferecem uma enorme diversidade de produtos cultivados em suas diferentes regiões. No Rio Grande do Sul, por exemplo, dois biomas predominam: o Pampa e a Mata Atlântica. Desde a colonização, a região sul, onde está localizado o bioma Pampa, tem sido marcada por intensa atividade agrícola, impulsionada pela pobreza da população da época e pela abundância de recursos naturais disponíveis para exploração (Valério Filho *et al.*, 2022).

Entre os diversos resíduos agroindustriais gerados nessa área, as folhas de oliveira se destacam, sendo produzidas em grandes quantidades durante a poda e a colheita das azeitonas. Apesar de sua relevância, esse subproduto ainda é pouco explorado. O crescente interesse nas folhas de oliveira deve-se ao seu alto teor de compostos fenólicos, como flavonoides e secoiridoides, incluindo a oleuropeína, que possui várias propriedades benéficas (Kiritsakis *et al.*, 2017).

Segundo Nunes *et al.* (2016), apenas 2% dos compostos fenólicos permanecem no azeite, enquanto 98% são retidos nos resíduos sólidos (folhas) e líquidos (sansa) do processo. Esses compostos são valorizados por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, e outras benéficas para a saúde (Albuquerque *et al.*, 2021), o que tem incentivado seu uso em diversas indústrias (Lama-Muñoz *et al.*, 2019).

Como resultado, pesquisadores têm buscado maneiras de recuperar e valorizar esses subprodutos de alto valor agregado. Tradicionalmente, as folhas de oliveira são utilizadas no tratamento de hipertensão, doenças infecciosas e inflamatórias, hiperglicemia, entre outras condições (Markin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; Ahmed

et al., 2014). No entanto, poucos estudos investigaram as atividades antibiofilme dos extratos de folhas de oliveira.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um extrato de um *blend* de folhas de *Olea europaea* L. da região sul do Brasil (EFO), com foco na análise de sua composição química e atividades antibiofilme contra microrganismos patogênicos.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparo do extrato hidroalcoólico de folhas de oliveira

O extrato foi preparado de acordo com o registro de patente número BR 10 2023 007641 6.

2.2. Análise da composição química do extrato hidroalcoólico de folhas de oliveira

O método utilizado para análise foi baseado em Ubessi *et al.* (2019), com adaptações na metodologia para um volume de injeção de 2 µL.

2.3. Determinação da atividade antibiofilme do extrato hidroalcoólico de folhas de oliveira

Para os ensaios foram utilizadas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25213), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (isolado clínico), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), e *Candida albicans* (ATCC 14053) pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral (LAPEMICRO) da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, RS. Os microrganismos foram mantidos em meio de cultura com glicerol e congelados a -80 °C. As amostras foram descongeladas, inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas por 24 horas. Após, foram semeadas em ágar Nutriente e Sabouraud (para as leveduras) e novamente incubada por 24 horas a 37 °C.

Para verificar se o extrato seria capaz de inibir a formação do biofilme bacteriano ou destruir o biofilme já pré-formado, utilizamos a técnica de acordo com

as condições previamente otimizadas descritas por Sandberg e colaboradores (2008), com modificações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Análise da composição química do extrato hidroalcoólico de folhas de oliveira

Os constituintes oleuropeína, rutina e hidroxitirosol foram detectados e quantificados a partir de curvas analíticas obtidas com estes padrões (Tabela 1).

Tabela 1. Análise dos compostos fitoquímicos majoritários do extrato hidroalcoólico de folhas de oliveira por LC-DAD.

Padrão	Teor (mg/g extrato liofilizado)	Equação da reta (r ²)	Comprimento de onda (nm)
Oleuropeína	5,36	y = 1729.5 x + 4.6683 (r ² = 0.9982)	250
Rutina	110,14	y = 2759,5 x + 29,976 (r ² = 0,9922)	250
Hidroxitirosol	8	y = 1670,7 x + 5,4694 (r ² = 0,9993)	280

Fonte: Construção da autora.

No presente estudo, a análise LC-DAD revelou as substâncias químicas encontradas no EFO. O resultado obtido indica que a rutina, o hidroxitirosol e a oleuropeína são os flavonóides predominantes no EFO. Pereira et al. (2007) identificaram a rutina, a apigenina - 7- O - glucósido e a luteolina – 7 – O - glucósido como os flavonóides mais abundantes num extrato aquoso de folhas de oliveira do nordeste de Portugal. Estes resultados foram corroborados por Makowska-Wąs et

al. (2017), que identificaram luteolina – 7 - O - glucósido, rutina e apigenina – 7 – O - glucósido como os flavonóides predominantes nas folhas de oliveira selvagem colhidas no sul de Portugal.

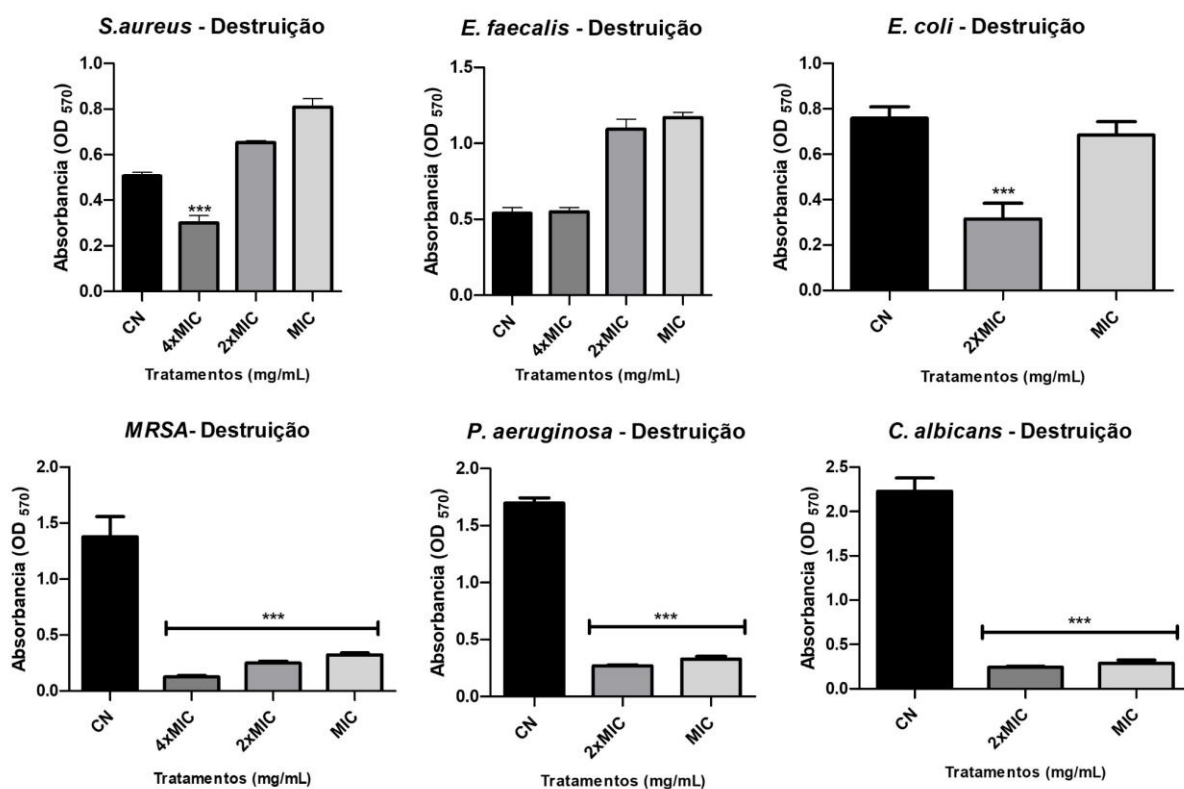
Em relação aos secoiridóides, a oleuropeína geralmente representa o derivado oleosídico mais característico das folhas de oliveira. No entanto, no presente trabalho, a oleuropeína se mostra quantitativamente em concentrações inferiores aos demais constituintes da matriz química do extrato, e isto se deve a bioconversão que ocorre em diferentes estágios da planta e de acordo com diferentes fatores, como maturação da planta, tipo de cultivar e época de colheita (Termentzi, Halabalaki, Skaltsounis, 2017).

Estes resultados também estão de acordo com os relatados por Benavente-Garcia et al. (2000) que mostraram que os polifenóis presentes nas folhas de oliveira consistem em oleuropeosídeos (oleuropeína e verbascosídeo), flavonóis (rutina) e fenol substituído (tiroso, hidroxitiroso, vanilina, ácido vanílico e ácido cafeico).

3.2.Determinação da atividade antibiofilme do extrato hidroalcoólico de folhas de oliveira

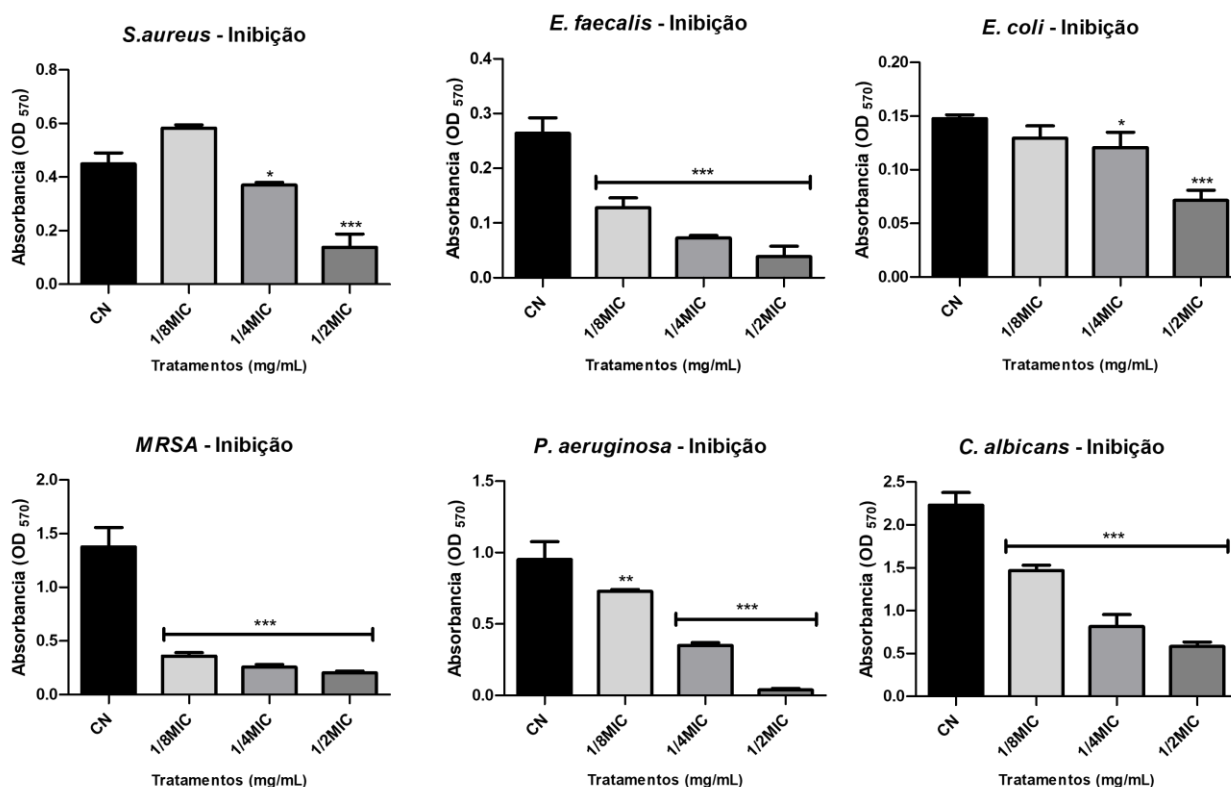
Os resultados demonstraram que o extrato foi capaz de causar a destruição parcial significativa e o retardo no crescimento (concentrações 4x maiores que a MIC) dos biofilmes pré-formados por todos os microrganismos testados, exceto contra *E. faecalis* (Figura 1), e foi capaz de inibir o crescimento e prevenir o desenvolvimento (concentrações menores que a MIC) dos biofilmes em formação de todos os microrganismos testados (Figura 2).

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico das folhas de oliveira na destruição de biofilme pré-formado por microrganismos patogênicos.



Fonte: Construção da autora.

Figura 2. Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico das folhas de oliveira na inibição do crescimento do biofilme em formação por microrganismos patogênicos.



Fonte: Construção da autora.

Biofilmes bacterianos são aglomerados de células envoltos em uma matriz polimérica extracelular que as bactérias produzem como uma estratégia de sobrevivência em condições adversas (Karunasagar *et al.*, 1994). Esses biofilmes são difíceis de erradicar e podem servir como reservatórios de patógenos, causando infecções crônicas em áreas como medicina, indústria alimentícia, agricultura e aquicultura (Bourne *et al.*, 2006).

Deepika *et al.* (2018) demonstraram que a rutina, um flavonoide presente no extrato de folhas de oliveira (EFO), pode inibir a adesão bacteriana, sendo eficaz no tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. A rutina apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 800 µg/mL contra essa bactéria. A inibição da formação de biofilme foi mais eficaz quando a rutina (200 µg/mL) foi combinada com o antibiótico gentamicina (2,5 µg/mL).

Além disso, flavonoides como a rutina exibem propriedades antioxidantes benéficas para os hospedeiros e podem agir como pró-oxidantes contra patógenos, induzindo estresse oxidativo e gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) que levam à morte bacteriana (Fathima & Rao, 2016). A atividade antibiofilme do extrato das folhas de oliveira também pode ser atribuída aos compostos fenólicos presentes no extrato, como a oleuropeína, que pode aumentar a permeabilidade das membranas celulares bacterianas, facilitando sua ruptura (Edziri *et al.*, 2019).

4. CONCLUSÃO

Os resultados revelam o significativo potencial bioativo do extrato das folhas de oliveira demonstrado pela presença significativa de compostos fitoquímicos, como rutina, hidroxitirosol e oleuropeína, cujas propriedades benéficas são amplamente documentadas. Esses compostos fenólicos são possivelmente responsáveis pela eficácia do extrato tanto na prevenção, quanto na destruição de biofilmes formados por microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

Os resultados deste estudo indicam que o EFO possui um grande potencial antibiofilme. Esses resultados evidenciam o potencial do extrato de folhas de oliveira como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes contra infecções causadas por microrganismos patogênicos, contribuindo para estratégias sustentáveis e inovadoras na utilização de subprodutos da olivicultura, reforçando a importância da valorização das folhas de oliveira como um resíduo agroindustrial, promovendo a sustentabilidade ecológica e a economia circular.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e com o apoio da Empresa Don José Azeites de Oliva de Caçapava do Sul, RS.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.M. et al. Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 53–56, 3 jun. 2014.
- ALBUQUERQUE, B. R. et al. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14–29, 2021.
- BENEVANTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 457- 462, 2000.
- BOURNE, D.G. et al. Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. **Aquaculture**, v. 260, n. 1–4, p. 27–38, set. 2006.
- DEEPIKA, S.M. et al. Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Food Control**, v. 90, p. 282 – 294, 2018.
- EDZIRI, H. et al. A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01604, maio 2019.
- FATHIMA, A. et al. Selective toxicity of Catechin—a natural flavonoid towards bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6395–6402, 2016.
- KARUNASAGAR, I. et al. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. **Aquaculture**, v. 140, n. 3, p. 241–245, mar. 1996.
- KIRITSAKIS, K. et al. Valorization of Olive Leaves: Spray Drying of Olive Leaf Extract. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 4, p. 619–633, 19 abr. 2018.
- LAMA-MUÑOZ, A. et al. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. **Food Chemistry**, v. 320, p. 126626, ago. 2020.
- MAKOWSKA-WĄS, J. et al. Identification of Predominant Phytochemical Compounds and Cytotoxic Activity of Wild Olive Leaves (*Olea europaea* L. ssp. *sylvestris*) Harvested in South Portugal. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 3, 11 mar. 2017.



MARKIN, D. et al. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern *in vitro*. **Mycoses**, v. 46, n. 3–4, p. 132–136, 4 mar. 2003.

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

SANDBERG, M. et al. Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 3, p. 233–240, set. 2008.

TERMENTZI, A.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A. L. From Drupes to Olive Oil: An Exploration of Olive Key Metabolites. *In: Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 147–177.

UBESSI, C. et al. Chemical composition of chamomile essential oil cultivated with homeopathy. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 4, p. 342–350, 4 jul. 2021.

VALÉRIO FILHO, A. et al. Perspectives of the reuse of agricultural wastes from the Rio Grande do Sul, Brazil, as new adsorbent materials. *In: Biomass-Derived Materials for Environmental Applications*. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 243–266.

WANG, L. et al. The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 5, p. 235–243, 24 ago. 2008.