UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

COSMO FERNANDO PACETTA

# Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína

**Pirassununga**
**2013**

COSMO FERNANDO PACETTA

# Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Bernardo Gonçalves

**Pirassununga**
**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

P115e

Pacetta, Cosmo Fernando
Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (Olea europaea) contendo Oleuropeína / Cosmo Fernando Pacetta. -- Pirassununga, 2013.
82 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos
Orientadora: Profa. Dra. Cintia Bernardo Gonçalves.

1. Oleuropeína 2. Folhas de oliva 3. Métodos de Extração 4. Extração com solventes 5. Extração com ultrassom. I. Título.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, como eu, acreditam que podemos melhorar um pouco mais o mundo em que vivemos.

# AGRADECIMENTOS

A meus queridos pais, Cosmo e Mara, por, em uma época de poucos recursos, principalmente tecnológicos, apoiaram meus sonhos de criança, incentivando e confiando que um dia seria realizado.

Á minha esposa, Rose, companheira carinhosa e paciente, que me deu o suporte fundamental e necessário para que eu chegasse até aqui.

Ás minhas filhas, Marina e Carolina, que me mostraram o fruto do respeito e do amor incondicional.

À minha orientadora, Dra. Cintia Bernardo Gonçalves, por sua presença ao longo da jornada.

Á minha amiga e presente colaboradora, Dra. Vanny Ferraz, que dedicou seu tempo, conhecimento e laboratório para que eu pudesse encontrar o objeto desta pesquisa.

À Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, pelo espaço, apoio e crédito em minha pesquisa.

Á Universidade Federal de Minas Gerais e seus laboratórios por permitirem que, sob a supervisão da Dra. Vanny Ferraz, eu pudesse efetuar os testes necessários.

Às Professoras Alessandra Lopes de Oliveira, Carmen Sílvia Fávaro Trindade e Christianne Elisabete da Costa Rodrigues, da FZEA/USP, que disponibilizaram equipamentos de seus respectivos laboratórios para que eu pudesse realizar algumas etapas experimentais da pesquisa.

Ao especialista de laboratório Marcelo Thomazini, e aos técnicos Keila Kazue Aracava e Nilson José Ferreira, pelo apoio na utilização dos equipamentos utilizados nesta pesquisa.

Às graduandas em engenharia de alimentos da FZEA/USP e bolsistas de iniciação científica Bruna Estella Perri e Pâmela Ferreira Neves, que me auxiliaram na execução dos experimentos.

A todos que me brindaram com entendimento e amor ao me transmitirem o suporte desta ousada jornada em minha vida, pois me ajudaram a superar todos os obstáculos.

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”. (John Dewey)

# RESUMO

PACETTA, C. F. **Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína.** 2013. 82f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

A oleuropeína é o mais abundante biofenol presente nas folhas de oliveira (*Olea Europaea*), com importantes funções antimicrobiana e antioxidante. Estudos visando à obtenção deste composto têm sido conduzidos, porém, muitos deles utilizam solventes tóxicos e métodos caros. A presente dissertação teve por objetivo estudar diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliva contendo quantidades significativas de oleuropeína. Os extratos foram obtidos a partir de folhas de oliva micronizadas, com ou sem pré-tratamento para redução do teor de clorofila, submetidas a contatos simples ou múltiplos com diferentes solventes, como dietil éter, clorofórmio, acetona, etanol, 1-propanol, 2-propanol, água e soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações. O contato das folhas micronizadas com os solventes foi promovido pelos seguintes métodos: agitação manual em temperatura ambiente, agitação mecânica a 50 ºC, ultrassom ou uma combinação desses dois últimos, totalizando 38 experimentos, sendo que em 17 destes os extratos foram produzidos na forma líquida e 21 na forma sólida. Os resultados mostraram que, de maneira geral, a etapa prévia de redução do teor da clorofila (realizada através de sucessivos contatos com hexano, diclorometano ou ainda, com $CO_2$ supercrítico) não foi vantajosa, devido à elevada quantidade de solventes utilizados em relação às quantidades de extratos obtidos. Nestes experimentos, a maior concentração de oleuropeína, 1,88%, foi detectada no procedimento em que as folhas micronizadas foram previamente umedecidas com etanol e limpas com $CO_2$ supercrítico, e posteriormente colocadas em contato com a mistura etanol e água, na proporção 1:1, utilizando o ultrassom combinado com a agitação mecânica como método de extração. Nos experimentos finais do trabalho, foi estudada ainda a adição de ácidos orgânicos (cítrico ou acético), juntamente com os solventes hidroalcoólicos (diferentes teores de água) no momento da

extração da oleuropeína em banho de ultrassom, utilizando amostras que não foram previamente tratadas para remoção da clorofila. A combinação do ácido acético com a solução etanólica contendo 30 % de água resultou em um extrato com 2,17 % de oleuropeína, em apenas 1 contato com o solvente. Quando três contatos foram utilizados, nestas mesmas condições, o teor de oleuropeína aumentou para 4,8 %, maior do que alguns valores encontrados na literatura, utilizando o mesmo método de extração, indicando que processo ainda pode ser otimizado, utilizando técnicas simples e solventes que não agridam o meio ambiente.

Palavras-chave: Oleuropeína, Folhas de oliva, Métodos de extração, Extração com solventes, Extração assistida por ultrassom.

# ABSTRACT

PACETTA, C. F. **Study of different methodologies for obtaining extracts from olive leaves (*Olea europaea*) containing oleuropein.** 2013. 82f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Oleuropein is the most abundant biofenol present in olive leaves (*Olea europaea*), presenting important antioxidant and antimicrobial functions. Studies focusing on obtaining this compound have been conducted; however, many of them use toxic solvents and expensive methods. The present work aimed to study different methodologies for obtaining extracts from olive leaves containing significant amounts of oleuropein. The extracts were obtained from micronized olive leaves, with or without pretreatment for reducing the chlorophyll content, submitted to single and multiple contacts with different solvents such as diethyl ether, chloroform, acetone, ethanol, 1- propanol, 2 -propanol, water and hydroalcoholic solutions at different concentrations. The contact between the micronized leaves and the solvents was promoted by the following methods: manual shaking at room temperature, mechanical agitation at 50 °C, ultrasound or a combination of these last two methods, totaling 38 experiments, from which in 17 of them the extracts were produced in the liquid form, and in 21 in the solid form (as a powder). The results show that, in general, previous step of reducing the content of chlorophyll (performed by successive contacts with hexane, dichloromethane or with supercritical $CO_2$) was not advantageous due to the high amount of solvent used in relation to amounts of extracts. In these experiments, the highest concentration of oleuropein, 1.88 % was detected in the procedure in which the micronized leaves were previously soaked with ethanol and cleaned with supercritical $CO_2$ and then placed in contact with the mixture of ethanol and water in the proportion 1:1, using ultrasound combined with mechanical agitation as extraction method. In the last experiments of the work, the addition of organic acids (citric or acetic acid) together with hydroalcoholic solvents (different water contents) in the extraction of oleuropein

in ultrasound was studied, using samples that have not previously been treated for removal of chlorophyll. The combination of acetic acid to the ethanolic solution containing 30 % of water resulted in an extract with 2.17 % of oleuropein, with only one contact to the solvent. When three contacts were used, under the same conditions, the oleuropein content increased to 4.8 %, larger than some values found in the literature, using the same extraction method, indicating that the process can be further optimized using simple techniques and solvents that do not harm the environment.

Keywords: Oleuropein, Olive leaves, Extraction methods, Solvent extraction, Assisted ultrasound extraction.

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – A ÁRVORE DA OLIVEIRA 15

FIGURA 2.2 – MOLÉCULA DE OLEUROPEÍNA: ÁCIDO METIL ÉSTER (4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-DIIDROXIFENIL)ETOXI]-2-OXOETIL]-5-ETILIDENO-6-[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-TRIHIDROXI-6-(HIDROXIMETIL)-2-TETRAHIDROPIRANIL]OXY]-4H-PIRANO-3-CARBOXÍLICO 18

FIGURA 2.3 - CENTRIFUGA UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE AZEITE DE OLIVA. 21

FIGURA 3.1 – PÓ DAS FOLHAS DE OLIVA MICRONIZADAS 30

FIGURA 3.2 – ROTAEVAPORADOR UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS 33

FIGURA 3.3 - EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA. 36

FIGURA 3.4 – EXTRATOR DE BANCADA COM AGITAÇÃO MECÂNICA E CONTROLE DE TEMPERATURA. 36

FIGURA 3.5 – ASPECTO DOS EXTRATOS LÍQUIDOS OBTIDOS. 37

FIGURA 3.6 - LIOFILIZADOR UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS. 39

FIGURA 3.7 - AMOSTRAS LIOFILIZADAS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA. 39

FIGURA 4.1 – COMPARAÇÃO ENTRE OS EXPERIMENTOS E24 A E29: ☐ 3 ETAPAS DE EXTRAÇÃO COM AGITAÇÃO MECÂNICA; ☐ 1 ETAPA DE EXTRAÇÃO EM ULTRASSOM + 2 ETAPAS COM AGITAÇÃO MECÂNICA. 51

FIGURA 4.2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS EXPERIMENTOS E18 A E23: ☐ 3 ETAPAS DE EXTRAÇÃO COM AGITAÇÃO MECÂNICA; ☐ 1 ETAPA DE EXTRAÇÃO EM ULTRASSOM + 2 ETAPAS COM AGITAÇÃO MECÂNICA. 52

FIGURA 4.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS EXPERIMENTOS E18 A E20 E E24 A E26. 53

FIGURA 4.5 – COMPARAÇÃO ENTRE OS EXPERIMENTOS E30 A E37: ☐ ADIÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO; ☐ ADIÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO. 56

FIGURA A.1 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E1 (PRETO); E2 (VERMELHO); E4 (AZUL); E5 (ROXO); OLEUROPEÍNA PADRÃO (VERDE). 69

**FIGURA A.2 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E4 (PRETO); E6 (AZUL); OLEUROPEINA PADRÃO (VERMELHO). 70**

**FIGURA A.3 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E7 (VERMELHO); E8 (VERDE); E9 (AZUL); OLEUROPEINA PADRÃO 0,1% (PRETO). 71**

**FIGURA A.4 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E10 (VERDE); E11 (AZUL); E12 (VERMELHO); OLEUROPEINA PADRÃO 0,1% (PRETO). 72**

**FIGURA A.5 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E13 (VERDE); E14 (AZUL); E15 (VERMELHO); OLEUROPEINA PADRÃO 0,2% (PRETO). 73**

**FIGURA A.6 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E16 (VERMELHO); E17 (VERDE); OLEUROPEINA PADRÃO 0,5%. 74**

**FIGURA A.7 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E18 (VERDE); E21 (VERDE); E24 (PRETO); E27 (VERMELHO). 75**

**FIGURA A.8 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E19 (VERDE); E22 (PRETO); E25 (AZUL); E28 (VERMELHO). 76**

**FIGURA A.9 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E20 (VERDE); E23 (PRETO); E26 (AZUL); E29 (VERMELHO). 77**

**FIGURA A.10 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E30 (VERMELHO) E E34 (PRETO). 78**

**FIGURA A.11 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E31 (VERMELHO) E E35 (PRETO). 79**

**FIGURA A.12 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E32 (VERMELHO) E E36 (PRETO). 80**

**FIGURA A.13 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA OS EXPERIMENTOS: E33 (VERMELHO) E E37 (PRETO). 81**

**FIGURA A.14 – CROMATOGRAMA OBTIDO A 280 NM PARA O EXPERIMENTO E38 (PRETO). 82**

# LISTA DE TABELAS

**TABELA 3.1 – RESUMO E IDENTIFICAÇÃO DOS 38 EXPERIMENTOS REALIZADOS 43**

**TABELA 4.1 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 45**

**TABELA 4.2 – ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 46**

**TABELA 4.3 – RESULTADOS OBTIDOS EM RELAÇÃO AO TEOR DE OLEUROPEÍNA E O RENDIMENTO GLOBAL 47**

# SUMÁRIO


**1. INTRODUÇÃO 13**

**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15**

**2.1. A OLIVEIRA E SEUS PRODUTOS 15**

**2.2. COMPOSTOS ATIVOS DAS FOLHAS DE OLIVA 17**

2.2.1. A OLEUROPEÍNA E SEUS ASPECTOS FUNCIONAIS 18

2.2.2. APLICABILIDADE DA OLEUROPEÍNA 20

**2.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO 21**

2.3.1. EXTRAÇÃO SIMPLES COM SOLVENTES 21

2.3.2. EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA 23

2.3.3. EXTRAÇÃO COM FLUIDO PRESSURIZADO 24

2.3.4. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM 26

2.3.5. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS 27

**3. MATERIAL E MÉTODOS 28**

**3.1. MATERIAL 28**

3.1.1. REAGENTES E VIDRARIAS 28

3.1.2. EQUIPAMENTOS 29

**3.2. MÉTODOS 29**

3.2.1. OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA. 29

3.2.2. PREPARO DA MATÉRIA PRIMA. 30

3.2.3. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA 30

3.2.3.1. Teor de Oleuropeína 30

3.2.3.2. Análises físico-químicas e microbiológicas 31

3.2.4. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE OLIVA. 31

3.2.5. ANÁLISE DE OLEUROPEÍNA NOS EXTRATOS 44

3.2.6. CÁLCULO DE RENDIMENTOS 44

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45**

4.1.1. TEOR DE OLEUROPEÍNA NAS FOLHAS MICRONIZADAS 45

4.1.2. RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA 45

**5. CONCLUSÕES 58**

**6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 60**

**REFERÊNCIAS 61**

**ANEXOS – PERFIS CROMATOGRÁFICOS 68**

# 1. INTRODUÇÃO

Além dos conhecidos efeitos benéficos que os antioxidantes promovem no corpo humano, a utilização dos mesmos em alimentos é fundamental para a prevenção de processos de oxidação que degradam, principalmente, vitaminas e outros compostos de alto valor nutricional. Atualmente, existem dois tipos de antioxidantes, os naturais e os artificiais. Apesar de serem considerados carcinogênicos, os antioxidantes artificiais (como BHT e BHA) têm sido bastante utilizados devido ao baixo custo e à boa estabilidade térmica. No entanto, é fato que a natureza oferece uma variedade infinita de produtos vegetais ricos em antioxidantes naturais, comprovadamente benéficos à saúde. Dentre esses compostos, destacam-se os terpenóides e os polifenóis, além de algumas vitaminas, como o tocoferol (vitamina E) (bastante encontrada em óleos vegetais) e o ácido ascórbico (vitamina C) (presente, principalmente em frutas).

As folhas de oliveira (*Olea Europaea*) são ricas em um composto fenólico chamado oleuropeína, o qual tem sido amplamente estudado devido ao seu alto poder antioxidante (AL-AZZAWIE; ALHAMDANI, 2006), além de propriedades anti-inflamatórias (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000). Ademais, possui outras ações farmacológicas promotoras da saúde, como antimicrobiana (BISIGNANO et al., 1999), antiviral (MICOL et al., 2005) e antitumoral (HAMDI; CASTELLON, 2005). Pesquisas também apontam a oleuropeína como inibidora do LDL (Low Density Lipoprotein), além de possuir uma atividade de proteção vascular por meio de inibição da agregação de plaquetas induzida por um fator de ativação (ANDRIKOPOULOS; ANTONOPOULOU; KALIORA, 2002). Trata-se de um glicosídeo, responsável pelo amargo presente nas azeitonas recém-colhidas, e que se decompõe facilmente durante o processo de maturação do fruto, através de hidrólise ácida ou enzimática (PEDROZA, 2010).

Alguns métodos para a obtenção deste componente a partir de folhas de oliveira têm sido estudados. Dentre eles destacam-se a extração

supercrítica (XYNOS et al., 2012), a extração dinâmica assistida por ultrassom (JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ; LUQUE DE CASTRO, 2006a) e a extração assistida por microondas (JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ, LUQUE DE CASTRO, 2006b). Todos esses trabalhos sugerem a utilização de soluções hidroalcoólicas para a extração do composto ativo, com diferentes teores de água no etanol. Existem ainda outros estudos sobre a obtenção de oleuropeína, porém estes trabalhos utilizam solventes orgânicos tóxicos e reagentes químicos que comprometem a segurança alimentar do produto (KEFALAS, 2007; ANSARI; KAZEMIPOURB; FATHIB, 2011).

A presente dissertação de mestrado teve como objetivo associar diferentes solventes (polares e apolares) a diferentes condições experimentais sugeridas na literatura, a fim de se estabelecer uma metodologia simples e barata, que permitisse a obtenção de extratos de folhas de oliveira orgânicas enriquecidos em oleuropeína. Os resultados corroboraram a aplicação do etanol acrescido de água como a melhor opção para esta finalidade,

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1. A Oliveira e seus produtos

Com o avanço tecnológico, cada vez mais o homem vem buscando condições de se tornar mais saudável e alcançar o sonho de se viver mais e melhor. A busca pelo bem estar e por melhores condições de vida não é privilégio dos dias atuais, mas sempre foi um desejo inerente ao próprio homem desde tempos remotos, quando foi em busca das propriedades terapêuticas e curativas das plantas.

Com a agitação da vida urbana essa busca vem se tornando emergencial, e não basta apenas haver produtos que tragam essa saúde, porém se ter produtos que tragam a saúde de forma natural e sustentável. É com esse quadro que os estudos sobre a Oliveira vêm se mostrando ser uma resposta a esses anseios cumprindo com missão de trazer saúde e longevidade ao homem.

A Oliveira (Figura 2.1) é conhecida, cientificamente, como *Olea europaea L.*, da família das *Oleaceae* (ARANTES, 2008).

**Figura 2.1 – A árvore da oliveira**

É uma das árvores mais citadas na literatura botânica e uma das mais importantes nos países mediterrâneos (ARANTES, 2008). O cultivo ocupa uma área de 8 milhões de hectares, o que demonstra a sua importância econômica e social (FERREIRA et al., 2007). Distingue-se das outras espécies frutíferas pela sua longevidade, chegando a atingir centenas de anos de vida. É um símbolo de paz, de sabedoria e de vitória (SONI et al., 2006). As suas raízes podem chegar a uma profundidade de 6 metros, captando do solo todos os elementos de que necessita para o seu desenvolvimento, conseguindo resistir a longos períodos de seca (ARANTES, 2008).

Seus frutos, as azeitonas, são conhecidos no mundo todo e muito apreciados. Durante seu desenvolvimento, ocorre uma série de modificações na sua composição, as quais podem influenciar de forma decisiva na qualidade dos produtos que serão destinados ao consumidor, isto é, as azeitonas de mesa e o azeite. As principais vitaminas presentes nas azeitonas são os carotenos (precursores de vitamina A), tiamina e riboflavina. Contêm ainda 50 % de água, 22 % de óleo (que é extraído para a produção do azeite), 19 % de açúcares, 5,8 % de celulose e 1,6 % de proteínas (ARANTES, 2008).

Outro produto da oliveira, o azeite, é extraído das azeitonas desde o período neolítico. Possui diversas aplicabilidades, como um poderoso hidratante para a pele (LIM et al., 2009), além de ser um importante componente alimentar responsável por gerar saúde e vitalidade ao organismo humano. Sua composição, rica no ácido oleico (monoinsaturado) lhe dá vantagens sobre outros óleos vegetais nos quais predominam os ácidos graxos polinsaturados, que são mais suscetíveis à oxidação e, por isso, muito mais instáveis (ARANTES, 2008).

Além do azeite e da azeitona, a Oliveira também fornece suas folhas, ricas em compostos fenólicos, principalmente a oleuropeína, que apresenta diversas atividades farmacológicas, tais como antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-aterogênicas, hipoglicemiante, anticancerígenas, antimicrobianas, antivirais, hipolipemiantes, entre outras.

As folhas vêm sendo comercializadas na forma de pó, que pode ser incorporado na alimentação ou utilizado na preparação de chás. O chá das folhas de Oliveira se revelou como um poderoso agente de saúde devido, principalmente, aos polifenóis que se acumulam nesta parte da árvore, podendo trazer benefícios maiores que o próprio azeite. Segundo Abaza et al. (2007) e Bao et al. (2007), os biofenóis que são absorvidos no trato gastrointestinal podem atingir concentrações significativas na circulação sanguínea. Desta forma, este produto pode ser uma importante alternativa aos antioxidantes sintéticos (ARANTES, 2008).

No ano de 2004, o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizado na cidade de Campinas – SP, realizou a caracterização das folhas de oliveira produzidas no Brasil, nas quais foram detectadas quantidades significativas de sais minerais e fibras. As folhas também apresentaram cerca de 2,98 g/100g de óleo em sua composição, sendo rica em ácidos palmítico (24,8 %), oleico (18,1 %), e alfa linolênico (37,5 %) (PACETTA, 2007).

## 2.2. Compostos ativos das folhas de oliva

As folhas de oliva possuem mais de 40 estruturas de ativos fenólicos, caracterizados por possuírem uma forte atividade antioxidante, especialmente devido ao seu alto potencial redox que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio, e supressores de oxigênio *singlet*. (KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA, 2011).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários sintetizados pelas plantas face à agressão por microrganismos e radiações ultravioleta (ARANTES, 2008). As folhas da oliveira são ricas em biofenóis, dos quais se destacam a oleuropeína e o hidroxitirosol (MICOL et al., 2005).

### *2.2.1. A Oleuropeína e seus aspectos funcionais*

A oleuropeína (Figura 2.2) é um composto fenólico não tóxico, que representa 73 % do total de constituintes presentes nas folhas de oliveira (*Olea Europaea*) (JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ; LUQUE DE CASTRO, 2006a; PEREIRA et al., 2007). Embora todas as partes da árvore contenham oleuropeína (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000), as folhas são a maior fonte deste composto fenólico (60-90 mg/g de folha seca) (LE TUTOUR; GUEDON, 1992). Segundo Arantes (2008), a alta concentração de oleuropeína nas folhas se deve às condições de armazenamento. Quando a folha é seca a 37ºC, o conteúdo em oleuropeína aumenta, devido ao desaparecimento quase que total dos outros polifenóis por oxidação.

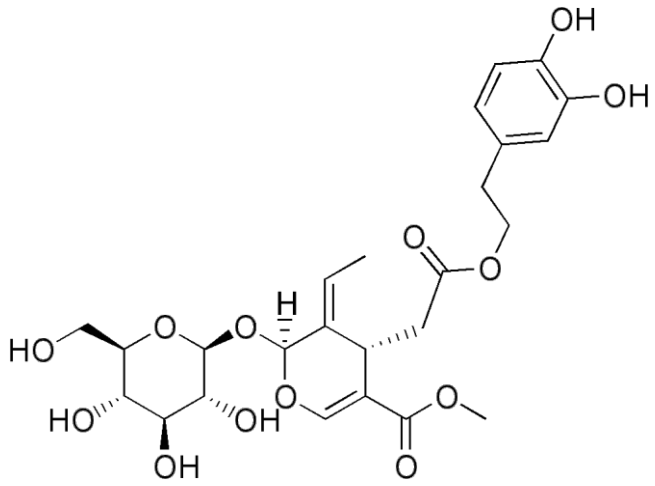


**Figura 2.2 – Molécula de oleuropeína: Ácido metil éster (4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-diidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil]-5-etilideno-6-[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2-tetrahidropiranil]oxy]-4H-pirano-3-carboxílico**

Trata-se de um glicosídeo amargo que pode ser hidrolisado em hidroxitirosol, ácido elenólico glucosido, aglicona oleuropeína e glicose (MANNA et al., 2004; AMIOT; FLEURIET; MACHEIX, 1989). No pó da folha de oliveira estão presentes agliconas secoiridóides e, acima de tudo, glicosidos, tais como, a dimetiloleuropeína, que sob condições de biotransformação

próprias é hidrolisada em hidroxitirosol (BRIANTE et al., 2004). A oleuropeína é também o principal composto fenólico da azeitona, sendo inclusive, o responsável pelo sabor amargo das azeitonas verdes. Ao longo da maturação do fruto, ou durante a produção do azeite, ocorrem reações de oxidação e de hidrólise dos compostos fenólicos mais complexos, como a oleuropeína. Desta forma, as substâncias fenólicas encontradas no azeite serão diferentes das que constituem o fruto. No caso da oleuropeína, esta libera o hidroxitirosol, apontado como um importante antioxidante no azeite de oliva (PEDROSA, 2010).

Juntamente com seu principal derivado, o hidroxitirosol, a oleuropeína apresenta um alto poder antioxidante (AL-AZZAWIE; ALHAMDANI, 2006; DE LA PUERTA et al., 2001) e importantes propriedades anti-inflamatórias (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000; VISIOLI et al., 2002). Ademais, possui outras ações farmacológicas promotoras da saúde, como antiaterogênica (VISIOLI; BOGANI; GALLI, 2006), antimicrobiana (BISIGNANO et al., 1999; SAIJA; UCCELLA, 2001; SUDJANA et al., 2009), antiviral (MICOL et al., 2005; LEE-HUANG et al., 2003; LEE-HUANG et al., 2007) e antitumoral (HAMDI; CASTELLON, 2005; MENENDEZ et al., 2007; HAN et al., 2009; GOULAS et al., 2009).

Pesquisas também apontam a oleuropeína como inibidora do LDL (*Low Density Lipoprotein*), além de possuir uma atividade de proteção vascular por meio de inibição da agregação de plaquetas induzida por um fator de ativação (ANDRIKOPOULOS; ANTONOPOULOU; KALIORA, 2002). CONI et al. (2000) realizaram um estudo com coelhos de laboratório alimentados com dietas especiais que continham azeite de oliva e oleuropeína. Os resultados indicaram que a adição de oleuropeína aumentou a capacidade do LDL em resistir à oxidação e, ao mesmo tempo, reduziu os níveis plasmáticos de colesterol total, livre e esterificado.

### *2.2.2. Aplicabilidade da oleuropeína*

A empresa Folhas de Oliva®, localizada no município de Estiva Gerbi – SP, vem há mais de 10 anos produzindo oliveiras orgânicas e certificadas. Sob o comando do seu gestor, e também autor desta dissertação, a empresa verificou que a adição de 5 gramas de folhas de oliveira secas e micronizadas por 10 dias a um frasco de 250 mL de azeite de oliva extravirgem (com teor inicial de oleuropeína igual a 0,037 mg), forneceu 18,7 mg de oleuropeína pura para essa unidade. No frasco de 500 mL o índice de oleuropeína passou de 37,4 mg, potencializando os efeitos já benéficos do azeite.

Este estudo comparativo mostra o quão importante é a descoberta do enriquecimento das folhas da oliveira no azeite de oliva e ainda mais importante, que ela pode ser integrada ao azeite não só extra virgem, mas também ao azeite comum, melhorando em 100 vezes, ou mais, suas características nutracêuticas.

Uma análise toxicológica realizada pelo Centro de Ciências Biológicas e da Saúde do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Laboratório de Biofármacos (Universidade Federal de Viçosa – MG) constatou que as folhas da oliveira micronizadas podem ser adicionadas com segurança ao azeite de oliva, pois são totalmente atóxicas[1].

Embora poderosa em seus benefícios, a oleuropeína é um principio ativo muito delicado, que pode ser degradado dependendo das condições as quais é submetido. Nas azeitonas em conserva, por exemplo, a oleuropeina se degrada por completo em função do processo produtivo e dos sais aplicados ao fruto para que sejam conservados e envasados.

Na extração a “frio” do azeite de oliva, que não é exatamente a frio, pois o sistema atinge temperaturas significativas em função da moagem e, principalmente, da centrífuga (Figura 2.3), a oleuropeína pode se degradar por

[1] Patentes número: PI0902441-7 A2 e PI 0701334-5 A2, pertencentes a Cosmo F. Pacetta, e à empresa Folhas de Oliva®.

completo a partir da segunda extração ou azeite virgem. Nesta centrifugação, a temperatura pode chegar a mais de 120ºC, degradando uma grande quantidade de moléculas de oleuropeína já que ela é termolábil e que pode se degradar à partir de 80ºC, segundo Ansari, Kazemipourb e Fathib (2011).

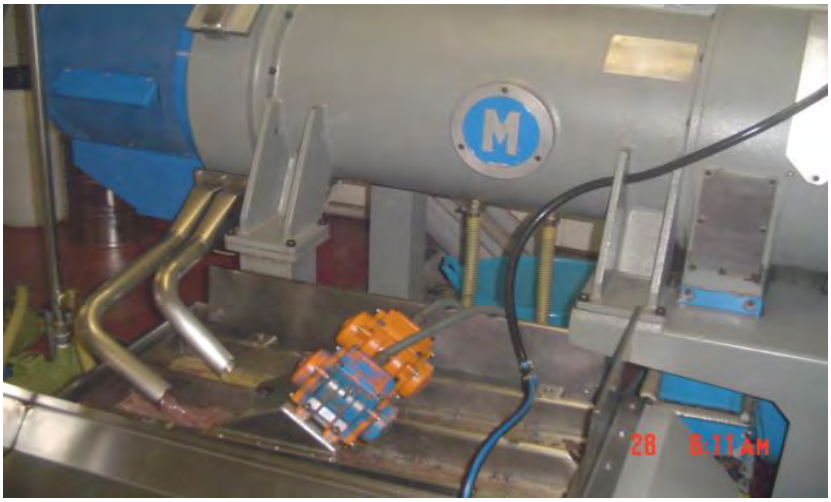

**Figura 2.3 - Centrifuga utilizada na produção de azeite de oliva.**

## 2.3. Métodos de extração

### *2.3.1. Extração simples com solventes*

Os compostos bioativos de plantas podem ser obtidos através de vários métodos, dentre eles, o mais simples consiste em submeter o material sólido ao contato com um solvente, sob agitação na temperatura desejada (AZMIR et al., 2013).

Japón-Luján e Luque de Castro (2006) estudaram a extração dinâmica de oleuropeína de folhas de oliva com etanol + água (70:30), em altas temperaturas (140 ºC) e altas pressões (6 bar), obtendo um valor máximo de 2,3 % do composto no extrato.

Jimenez et al. (2011) obtiveram um extrato hidroalcoólico contendo 29 % de oleuropeína, utilizando uma mistura de etanol e água (1:1) em contato por 24 horas. Nesse trabalho, as folhas foram previamente escaldadas a 95 ºC por 4,5 minutos, refrigeradas e secas.

Sahin, Bilgin e Dramur (2011) obtiveram até 10 % de oleuropeína no extrato seco obtido via Soxhlet com metanol. Com água, o rendimento do composto foi de aproximadamente 2 %, e com etanol, os autores obtiveram um rendimento bem inferior a este.

Stamatopoulos et al. (2012) estudaram o impacto de alguns pré-tratamentos, como branqueamento com água quente, vapor e radiação UV, sobre a extrabilidade da oleuropeína com etanol contendo 30 % de água. O melhor resultado, em torno de 0,8 % de oleuropeína, foi obtido utilizando pré-tratamento com vapor.

Mylonaki et al. (2008) estudaram a otimização de condições de pH, % de etanol e tempo para a extração de polifenóis totais de folhas de oliva, utilizando metodologia de superfície de resposta. No entanto, o trabalho dos autores não quantifica especificamente o teor de oleuropeína nos extratos.

Existem ainda outros estudos sobre a obtenção de oleuropeína, porém estes trabalhos utilizam solventes orgânicos tóxicos e reagentes químicos que comprometem a segurança alimentar do produto (KEFALAS, 2007). A extração com metanol e nitrogênio líquido seguida da exclusão da clorofila através de éter de petróleo, purificação com resina XAD e colunas de gel de sílica geram um produto com pureza entre 50 a 70%, mas comprometido com moléculas pesadas (KEFALAS, 2007).

Ansari, Kazemipourb e Fathib (2011) sugerem um método simples para a extração da oleuropeína de folhas de oliva com água acidificada com ácido clorídrico em várias temperaturas, além de solventes hidroalcoólicos, metanol, hexano e diclorometano, todos em temperatura ambiente. Os autores constataram que a água acidificada com HCl a 60 ºC apresentou a maior

capacidade na extração de oleuropeína (aproximadamente 0,7 %), sendo que valores muito menores foram obtidos para os solventes hidroalcoólicos.

### *2.3.2. Extração supercrítica*

Dentre os vários métodos que vem sendo utilizados para a obtenção de diversos compostos (incluindo antioxidantes) a partir de matrizes vegetais, destaca-se a extração com $CO_2$ supercrítico (LEAL et al., 2003; GELMEZA; KINCALA; YENERB, 2009; CASTRO-VARGAS et al., 2010; SANTOS et al., 2012; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012).

A extração com fluido supercrítico é uma técnica relativamente recente, e que apresenta algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais, como o uso de baixas temperaturas, o reduzido consumo de energia e alta qualidade do produto obtido (GARCIA-SALAS et al., 2010).

O dióxido de carbono ($CO_2$) é o solvente mais utilizado nesta técnica, devido, principalmente, ao fato de suas propriedades críticas (temperatura e pressão) serem moderadas (31,1 ºC e 73,8 MPa). Outras vantagens deste solvente são a sua disponibilidade, não-toxicidade e estabilidade química (CASTRO-VARGAS et al., 2010).

Castro-Vargas et al. (2010) utilizaram o $CO_2$ supercrítico na obtenção de compostos fenólicos a partir de sementes de goiaba, e obtiveram teores menores do que os obtidos através de extração Soxhlet com etanol. No entanto, os maiores teores foram obtidos quando se utilizou etanol como co-solvente na extração com o $CO_2$ supercrítico. Segundo os autores, o uso do etanol como co-solvente favorece o enriquecimento da fração fenólica, pois seu rendimento está diretamente ligado com a polaridade do solvente utilizado.

Mais especificamente para a oleuropeína, Xynos et al. (2012) obtiveram um extrato seco com 30 % do composto, utilizando 20 % de etanol como co-solvente durante a extração com $CO_2$ supercrítico a 300 bar (temperatura não mencionada). Os autores também constataram que o

rendimento de oleuropeína é nulo quando apenas 5 % de co-solvente é utilizado. Já Jimenez et al. (2011), utilizando essa mesma porcentagem de co-solvente e mesma pressão de operação (300 bar), porém a 40 ºC, obtiveram um teor de oleuropeína bem menor, igual a 6,7 %.

Sahin, Bilgin e Dramur (2011) estudaram o efeito da temperatura (50 e 100 ºC), da pressão (100, 200 e 300 bar) do co-solvente (etanol, metanol e água) sobre o rendimento da oleuropeína após a extração supercrítica. Os autores constataram que o maior teor do composto foi obtido nas condições de maior pressão e temperatura, utilizando 20 % de metanol como co-solvente, o que resultou em aproximadamente 6 % de oleuropeína no extrato sólido. Nas mesmas condições, porém utilizando o etanol como co-solvente, o teor de oleuropeína obtido foi de aproximadamente 0,8 % no extrato sólido. Em um trabalho posterior, Sahin e Bilgin (2012) estudaram as mesmas condições de processo, porém utilizando etanol ou água como co-solvente, variando suas vazões. O maior rendimento obtido, 4,7 % de oleuropeína no extrato seco, ocorreu ao se utilizar a água como co-solvente, a 100 ºC e 300 bar, a 1 mL/min (maior vazão utilizada), resultado semelhante ao obtido pelos menos autores em seu trabalho anterior, 4,5 % (SAHIN; BILGIN; DRAMUR, 2011). Já para o etanol como co-solvente, foi observado um teor de oleuropeína igual a 1,6 %, o dobro do obtido no trabalho prévio dos autores, porém a uma temperatura de 50 ºC.

Mesmo com o alto rendimento relatado pelos autores, a extração com fluido supercrítico tem como inconveniente a alta pressão necessária para a operação, que requer equipamentos excessivamente caros, elevando o custo do produto final (HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006).

### *2.3.3. Extração com fluido pressurizado*

A extração com fluido pressurizado é uma técnica nova que vem sendo utilizada para o isolamento de componentes a partir de amostras sólidas.

Consiste na utilização de solventes orgânicos em altas pressões e temperaturas acima de seus pontos normais de ebulição (KLEJDUSA et al., 2009). Geralmente, a amostra sólida é empacotada em uma célula extratora e colocada em contato com o solvente em temperaturas variando de 40 a 200 ºC, e pressões entre 35 e 200 bar, por curtos períodos de tempo (5–15 min) (GARCIA-SALAS et al., 2010). Devido a estas condições de temperatura e pressão, a quantidade necessária de solvente para a extração é reduzida, assim como o tempo de processo (AZMIR et al., 2013).

Este processo tem sido bastante aplicado para a extração de diversos compostos bioativos presentes em plantas. Rostagno, Palma e Barroso (2004) utilizaram o processo para obter isoflavonas a partir de sementes de soja, sem que houvesse degradação. Shen e Shao (2005) também utilizaram fluido pressurizado para extrair terpenóides e esteróis de tabaco e, comparando com outros métodos, este proporcionou o melhor resultado. Howard e Pandjaitan (2008), ao estudarem a extração de flavonóides de espinafre, constataram que a mistura de etanol e água (70:30) pressurizada foi mais eficiente do que água nas mesmas condições. Santos, Veggi e Meireles (2012) também conseguiram uma alta recuperação de antocianinas e outros compostos fenólicos de jabuticaba utilizando a técnica de fluido pressurizado.

Especificamente para a oleuropeína, Xynos et al. (2012) compararam os resultados da extração feita com fluido pressurizado nas folhas de oliveira secas, e também em folhas que foram previamente “limpas” por extração supercrítica. No primeiro procedimento, os autores obtiveram cerca de 16 % do componente no extrato seco, utilizando etanol a 115 ºC; no segundo procedimento, o máximo obtido foi ao redor de 10 % utilizando água a 150 ºC. Estes resultados contradizem, aparentemente, os obtidos por Ansari, Kazemipourb e Fathib (2011), que constataram uma degradação do composto em temperaturas de 80 ºC, porém utilizando água não pressurizada.

Mesmo com os bons resultados já reportados, o uso de altas temperaturas para a obtenção de compostos bioativos deve ser cauteloso, pois

outras reações podem ocorrer durante o processo, sendo que novos compostos (indesejáveis ou não) podem se formar nos extratos (HERRERO et al., 2013).

### *2.3.4. Extração assistida por ultrassom*

O processo de extração por ultrassom é considerado uma das técnicas mais simples de se trabalhar, devido, principalmente, ao fácil manuseio do equipamento laboratorial (banho de ultrassom). Neste método, o material sólido é colocado em contato com o solvente desejado no interior de um banho de ultrassom, no qual se pode controlar a temperatura e o tempo de extração (KLEJDUSA et al., 2009; GARCIA-SALAS et al., 2010).

A aplicação do ultrassom na área de alimentos tem crescido bastante, pois a técnica facilita a extração de compostos a partir de matrizes vegetais. A energia das ondas ultrassônicas é transmitida em frequência superior à capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz), se propagando na matéria e criando um ciclo de expansão, podendo gerar bolhas ou cavitação (VEGGI, 2013; LUQUE-GARCÍA e DE CASTRO, 2003). Além do aumento da permeabilidade das paredes celulares, essa cavitação promove um forte estresse mecânico das células, facilitando a dilatação e a hidratação do material. Consequentemente, os poros da parede celular aumentam, favorecendo a transferência de massa (VEGGI, 2013).

Japón-Luján, Luque-Rodríguez e Luque de Castro (2006a) utilizaram a extração dinâmica assistida por ultrassom para obter oleuropeína a partir de folhas de oliveira. Os autores utilizaram uma mistura de etanol e água (1:1) como solvente, na temperatura de 40 ºC, resultando em um extrato com 2,3 % de oleuropeína, menor do que os obtidos em alguns dos trabalhos já mencionados utilizando fluido supercrítico ou pressurizado.

### *2.3.5. Extração assistida por microondas*

Assim como o ultrassom, a extração assistida por microondas também é considerada uma técnica nova de obtenção de uma série de biocompostos (PARÉ; BÉLANGER; STAFFORD, 1994). O mecanismo de extração do processo envolve três etapas sequenciais: primeiro, separação dos solutos presentes nos sítios ativos das matrizes vegetais através do aumento da temperatura e da pressão; segundo, difusão do solvente através da amostra sólida; terceiro, liberação dos solutos para o solvente (ALUPULUI, 2012).

Segundo Cravottoa et al. (2008), as microondas produzem um rápido aquecimento da matriz, facilitando a extração dos compostos bioativos, além de utilizar um equipamento pequeno e proporcionar um alto rendimento do extrato. Também pode ser considerada uma técnica “verde”, devido ao reduzido uso de solventes orgânicos (ALUPULUI, 2012).

Pan, Niu e Liu (2003) utilizaram as microondas para extrair polifenóis e cafeína de folhas de chá verde, obtendo o máximo de extração em apenas 4 minutos, enquanto que em processos tradicionais, o tempo gasto para obter o mesmo rendimento foi de 20 horas. Shu, Ko e Chang (2003) também reduziram de 10 horas para 15 minutos o tempo de extração de ginsenóides a partir de raízes de ginseng. Outros trabalhos também observaram a melhora no tempo de extração de diferentes biocompostos utilizando o processo assistido por microondas (DHOBI; MANDAL; HEMALATHA, 2009; ASGHARI; ONDRUSCHKA; MAZAHERITEHRANI, 2011; CHIREMBA; ROONEY; TRUST, 2012; HUI; GHAFOOR; CHOI, 2009).

Utilizando uma mistura de etanol e água (80:20), Japón-Luján, Luque-Rodríguez e Luque de Castro. (2006b) obtiveram um teor de oleuropeína igual 2,3 % usando a extração assistida por microondas. Os mesmos autores obtiveram um valor parecido no trabalho já mencionado utilizando o ultrassom (JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ; LUQUE DE CASTRO, 2006a).

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1. Material

### *3.1.1. Reagentes e vidrarias*

- Folhas de oliveiras orgânicas certificadas (Folhas de Oliva®);
- Hexano (Synth, pureza > 99 %);
- Acetona (Synth, pureza > 99 %);
- Dietil éter (Ecibra, pureza > 99 %);
- Clorofórmio (Synth, pureza > 99 %);
- 1–Propanol (Sigma-Aldrich, pureza > 99 %);
- 2–Propanol (Merck, pureza > 99 %);
- 1-Butanol (Synth, pureza > 99 %);
- Etanol grau alimentício (Emfal, pureza > 99 %);
- Água destilada e deionizada;
- Ácido acético (Synth, pureza > 99 %);
- Ácido cítrico (Synth, pureza > 99 %);
- Oleuropeína padrão 98,0 % (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltda);
- Reagentes específicos para cromatografia: metanol (Tedia, pureza > 99 %) e ácido tricloroacético (Vetec, pureza > 99 %);
- Vidrarias em geral.

### *3.1.2. Equipamentos*

- Balança semi-analítica (AE Adam, modelo PGW 1502i);
- Balança analítica (Adam, modelo A200);
- Estufa a vácuo (Tecnal, modelo TE395);
- Agitador mecânico com controle de temperatura (Tecnal, modelo TE139);
- Evaporador rotativo (Tecnal, modelo TE211);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência série 20A (SHIMADZU);
- Centrifuga (Thermo Electron Corporation, modelo CR3i multifunction);
- Densímetro (Anton Paar, modelo DMA 4500);
- Banho termostatizado (Tecnal, modelo TE2005);
- Banho ultrassom (Unique, modelo USC-1400);
- Extrator supercrítico (Sulab);
- Liofilizador (Terroni, modelo LC 1500).

## 3.2. Métodos

### *3.2.1. Obtenção da matéria prima.*

As folhas de oliveira orgânicas certificadas foram colhidas da mesma árvore e processados em um único lote (lote nº 11/2009, fabricação 10/11/2009, validade 10/11/2014) pela empresa Folhas de Oliva Produtos Naturais (Estiva Gerbi-SP) e doadas para esta pesquisa.

### *3.2.2 Preparo da matéria prima.*

Para aumentar a área de contato com o solvente e a disponibilidade do composto a ser extraído, as folhas verdes (in natura) foram micronizadas (Figura 3.1), isto é, foram secas (à temperatura ambiente) e, em seguida, moídas para a obtenção de um pó com partículas contendo de 0,05 a 1,00 mm de diâmetro. A micronização é um processo de moagem ultrafina de produtos por meio de moinhos com ar comprimido. A moagem ocorre devido ao choque entre as partículas do próprio produto que, juntamente com o ar comprimido atinge uma velocidade de até 500 m/s. Com esse choque as partículas diminuem de tamanho até atingir a qualidade desejada. Nesse processo não há aumento de temperatura.

**Figura 3.1 – Pó das Folhas de Oliva micronizadas**

### *3.2.2. Caracterização da matéria-prima*

#### *3.2.2.1. Teor de Oleuropeína*

A análise das folhas de oliveira em relação ao teor de oleuropeína foi realizada utilizando-se o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com cromatógrafo da marca Shimatzu, série 20A, consistindo de 2

bombas LC-20AT, detector UV-Vis SPD-20A, válvula Rheodyne com loop de 20 µl e software de aquisição de dados LCSolution. Nesta análise foram utilizados como padrão: Oleuropeína com 98% de pureza (cat N0 008011), produzida pela empresa Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltda. Vale ressaltar que essa análise foi realizada nas folhas secas, já micronizadas.

#### *3.2.2.2. Análises físico-químicas e microbiológicas*

A caracterização físico-química e microbiológica das folhas de oliveira micronizadas foi realizada pelo GMO – Centro de Pesquisas e Controle de Qualidade, localizado em Belo Horizonte – MG. Foram realizadas análises em relação ao teor de umidade, pH, cinzas totais e insolúveis. As análises microbiológicas consistiram na contagem total de bactérias e de fungos, além das contagens específicas para: Enterobactérias, *Escherichia coli*, *Staphylococus aureus*, *Salmonella sp* e *Pseudomonas sp*.

Todas as análises foram realizadas de acordo com procedimentos operacionais padrão do GMO, baseados em métodos oficiais. O teor de umidade foi determinado em estufa de convecção forçada a 105 ºC até massa constante (Ac 2-41, AOCS, 1998). As cinzas foram determinadas por incineração em mufla a 550°C, de acordo com a metodologia estabelecida AOAC (2007). Para a determinação do pH, as folhas foram misturadas com água, sendo o sistema agitado até que as partículas ficassem uniformemente suspensas, seguido pela imersão do eletrodo devidamente aferido (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### *3.2.3. Obtenção do extrato de folhas de oliva.*

Durante o decorrer desta dissertação de mestrado, foram realizados 38 experimentos para a obtenção de extratos de folhas de oliveira. As variações nos procedimentos foram sendo estabelecidas de acordo com os resultados

parciais da quantificação de oleuropeína nos extratos. Deste modo, além do tipo e da quantidade de solvente, também foram variadas as massas de folhas utilizadas para a extração. Além disso, em vinte e dois (do total de 38) experimentos foram utilizadas folhas de oliveira micronizadas que passaram por uma extração prévia da clorofila (presente naturamente nas folhas de oliveira), pois se acreditava que este componente pudesse interferir no rendimento da oleuropeína. Este procedimento de extração da clorofila foi realizado com solventes orgânicos ou com extração supercrítica. O detalhamento de cada procedimento adotado ao longo da pesquisa, em ordem cronológica, está apresentado a seguir.

*a) Experimentos 1 a 6*

Os experimentos 1 a 3 foram realizados utilizando-se folhas micronizadas previamente tratadas com **hexano**, para a redução do teor de clorofila. Esta etapa prévia foi realizada da seguinte maneira: em um béquer de 500 mL, pesaram-se (em balança semi-analítica) aproximadamente 30 g de folhas de oliveira micronizadas e adicionaram-se 100 mL de hexano, deixando a mistura sob agitação por 30 min. Em seguida, filtrou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento com mais 100 ml do solvente, até que as folhas perdessem (visualmente) a tonalidade esverdeada. As folhas sem clorofila foram então colocadas em estufa a 70 ºC para evaporar o restante do solvente por, pelo menos, 1 hora. Após a secagem das folhas, realizou-se a extração com os solventes: **dietil éter** (experimento 1), **clorofórmio** (experimento 2) e **acetona** (experimento 3). Cada experimento foi executado da seguinte maneira: em um tubo de centrífuga de 50 mL, pesou-se (em balança analítica) aproximadamente 1,0 g de folha micronizada e adicionou-se 40 mL do solvente. O tubo foi vedado e agitado manualmente por 30 minutos. As folhas foram deixadas em contato com o solvente por 24 horas agitando-se de vez em quando. Após este período, o tubo foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido em um frasco shott, filtrando-se a vácuo, para evitar

sólidos em suspensão. O conteúdo do frasco shott foi concentrado no rotaevaporador (Figura 3.2), sendo que o extrato líquido resultante foi analisado em relação ao teor de oleuropeína.

**Figura 3.2 – Rotaevaporador utilizado nos experimentos**

Este mesmo procedimento também foi adotado nos experimentos 4, 5 e 6, utilizando os mesmo solventes (dietil éter, clorofórmio e acetona, respectivamente), porém, sem a etapa prévia de extração da clorofila com o hexano.

*b) Experimentos 7 a 12*

Os experimentos 7 a 9 foram realizados utilizando-se folhas micronizadas previamente tratadas com **diclorometano** (como sugerido por MYLONAKI et al., 2008), para a redução do teor de clorofila. Esta etapa prévia foi realizada da mesma maneira que nos experimentos 1 a 3, apenas substituindo o hexano pelo diclorometano e secando as folhas a 50 ºC (para evaporação do diclorometano), como uma tentativa de se obter melhores

resultados no procedimento posterior (de extração da oleuropeína). A obtenção do extrato das folhas foi realizada seguindo-se o mesmo procedimento adotado nos experimentos 1 a 3, porém com os solventes **etanol** (experimento 7), **1-propanol** (experimento 8) e **2-propanol** (experimento 9), sendo o extrato líquido resultante conduzido à análise de quantificação da oleuropeína.

Analogamente, foram realizados os experimentos 10, 11 e 12, utilizando os mesmos solventes (etanol, 1-propanol e 2-propanol, respectivamente), porém, sem a etapa prévia de extração da clorofila com o diclorometano.

*c) Experimentos 13 a 15*

Nestes 3 experimentos (13 a 15), a etapa prévia de extração da clorofila também seguiu o mesmo procedimento adotado nos experimentos 1 a 3 e 7 a 9, porém, foram utilizados os solventes **hexano** e **diclorometano** de forma alternada, até que folhas perdessem visualmente a tonalidade esverdeada.

Para a extração da oleuropeina foram adotados os procedimentos realizados nos experimentos 1 a 12, porém, utilizaram-se **soluções hidroalcoólicas** contendo **70** (experimento 13), **50** (experimento 14) e **30 % de água** (experimento 15). Estas soluções foram preparadas gravimetricamente em balança analítica, sendo que o teor de água foi checado com o auxílio de um densímetro digital de bancada (DMA4500, Anton Paar), que além da densidade, fornece o teor alcoólico de soluções hidroalcoólicas. Nestes experimentos, a concentração do extrato líquido foi realizada em estufa a 50 ºC por até 4 horas, visto que o rotaevaporador encontrava-se indisponível no dia em que o experimento foi realizado.

*d) Experimentos 16 e 17*

Apesar dos solventes etanol e água não terem apresentado um bom resultado para a extração da oleuropeína nestes primeiros experimentos (como

será discutido na seção Resultados e Discussão), a partir do experimento 16, optou-se pela tentativa de aperfeiçoar o procedimento utilizando estes solventes, por serem não tóxicos e seguros para serem utilizados em alimentos ou fármacos. No experimento 16, foi realizada uma etapa de "limpeza" das folhas micronizadas em um extrator supercrítico (Figura 3.3). Esta limpeza teve como objetivo remover da matéria-prima não somente a clorofila, mas outros compostos apolares que pudessem interferir no rendimento da oleuropeína no processo posterior. Esse procedimento também foi utilizado em um artigo recentemente publicado por Xynos et al. (2012), durante a realização do presente trabalho. A extração supercrítica foi realizada com $CO_2$ como solvente, na temperatura de 50º C e pressão de 200 bar, sendo que as folhas micronizadas foram umedecidas com etanol (aproximadamente 15% da massa de folha) antes de serem colocadas no extrator. De acordo com Xynos et al. (2012), esse umedecimento das folhas com etanol pode auxiliar na remoção dos compostos apolares, mas sem remover a oleuropeína, desde que a quantidade deste solvente não seja muito alta. A extração foi feita durante 4 horas, sendo obtidas as folhas "limpas", que foram conduzidas para o procedimento de extração, e um conteúdo líquido, que foi posteriormente analisado para verificar se houve perdas do componente estudado, devido à presença do etanol. A extração da oleuropeína foi realizada em um extrator de bancada (Figura 3.4) com agitação mecânica (175 rpm) e controle de temperatura (Tecnal, modelo TE139), utilizando-se **etanol puro** (grau alimentício) como solvente. Foram utilizadas aproximadamente 20 g de folhas micronizadas "limpas", provenientes do extrator supercrítico, e aproximadamente 120 g de solvente, divididos em duas extrações sucessivas de 20 g de folhas micronizadas para 60 g de solvente cada. Cada extração foi feita durante 1 hora à temperatura de 50 ºC, sendo que o bagaço restante após a primeira extração foi utilizado para a segunda extração. O líquido obtido (Figura 3.5) das duas extrações foi filtrado e centrifugado para que se pudesse retirar o sobrenadante evitando-se sólidos em suspensão. O sobrenadante foi concentrado no rotaevaporador por aproximadamente 40 minutos e a quantia restante de amostra foi analisada em relação ao teor de oleuropeína.

**Figura 3.3 - Equipamento de extração supercrítica.**

**Figura 3.4 – Extrator de bancada com agitação mecânica e controle de temperatura.**

**Figura 3.5 – Aspecto dos extratos líquidos obtidos.**

Paralelamente, foi realizado o experimento 17, nas mesmas condições de extração utilizadas no experimento 16, porém sem a etapa de "limpeza da amostra" com extração supercrítica.

*e) Experimentos 18 a 20*

Nos experimentos 18 a 20, foram utilizadas as mesmas condições de processo adotadas no experimento 16, para a limpeza do material por extração supercrítica, porém sem umedecer a amostra com etanol antes de colocá-la no equipamento. Também foi feita uma modificação em relação ao número de contatos com solvente no processo de extração da oleuropeína: com o bagaço resultante (folhas limpas), foram feitas três extrações sucessivas utilizando-se

aproximadamente 10 g de matéria-prima e 90 g dos solventes (30 g em cada etapa): **etanol puro** grau alimentício (experimento 18), uma **mistura com 50 % de etanol e 50 % de água** (experimento 19) e **água pura** (experimento 20), também em um extrator com agitação e controle de temperatura. Da mesma forma descrita nos experimentos 16 e 17, o bagaço resultante de cada extração foi novamente submetido ao contato com o solvente novo, sendo que os líquidos resultantes foram misturados e concentrados em rotaevaporador por aproximadamente 40 minutos. Neste momento da pesquisa, surgiu a possibilidade de se utilizar um liofilizador (Figura 3.6) para a obtenção de um extrato sólido, o que possibilitou o cálculo dos rendimentos de maneira mais adequada. Desta forma, após a concentração no rotaevaporador, os extratos provenientes dos experimentos 18 e 19 foram diluídos em água, para que pudessem ser congelados em frezzer a -18 ºC por 24 horas (o extrato proveniente do experimento 20 foi direto para o congelador, pois foi inviável pré-concentrá-lo em rotaevaporador), e levados ao liofilizador até a secagem completa dos solventes. Os extratos secos (Figura 3.7) foram então analisados em relação ao teor de oleuropeína.

**Figura 3.6 - Liofilizador utilizado nos experimentos.**

**Figura 3.7 - Amostras liofilizadas do extrato das folhas de oliveira.**

*f) Experimentos 21 a 23*

Nos experimentos 21 a 23, foram utilizadas as folhas "limpas", resultantes da extração supercrítica realizada nos experimentos 18 a 20, para a realização da extração da oleuropeína, através de sucessivos contatos com os solventes: **etanol puro** grau alimentício (experimento 21), uma **mistura com 50 % de etanol e 50 % de água** (experimento 22) e **água pura** (experimento 23). O procedimento de extração foi o mesmo adotado nos experimentos 18 a 20, porém com uma variação no procedimento de extração: o primeiro contato do solvente com as folhas foi realizado em um banho de ultrassom, à temperatura ambiente, por 24 minutos, seguido de duas extrações sucessivas a 50 ºC no equipamento com agitação e controle de temperatura (mesmo utilizado nos outros experimentos). A proporção folha:solvente utilizada também mudou para 10:40, ou seja 10 g de bagaço 40 g de solvente em 4 contatos, totalizando o uso de 120 g de solvente. Para a obtenção dos extratos sólidos, os líquidos foram concentrados, diluídos em água (quando necessário), e liofilizados.

*g) Experimentos 24 a 26*

A mesma matéria-prima utilizada no experimento 16 (folhas umedecidas com etanol que passaram por limpeza com $CO_2$ supercrítico) foi empregada nos experimentos 24 a 26, com os mesmos solventes do item anterior, e repetindo-se o procedimento adotado nos experimentos 18 a 20 para a extração da oleuropeína (três contatos sucessivos com solvente em agitador mecânico a 50 ºC). A proporção folha:solvente foi estabelecida em 10:40, ou seja 10 g de bagaço 40 g de solvente em 4 contatos, totalizando o uso de 120 g de solvente. Para a obtenção dos extratos sólidos, os líquidos foram concentrados, diluídos em água (quando necessário), e liofilizados.

*h) Experimentos 27 a 29*

Os experimentos 27 a 29 foram realizados com a mesma matéria-prima utilizada nos experimentos 16, 24, 25 e 26 (folhas umedecidas com etanol que passaram por limpeza com $CO_2$ supercrítico), porém a etapa de extração conduzida por 1 contato em banho de ultrassom e 2 contatos no agitador mecânico a 50 ºC, como descrito nos experimentos 21 a 23. A proporção folha:solvente e o procedimento para a obtenção dos extratos sólidos também foram os mesmos dos experimentos anteriores (21 a 23).

*i) Experimentos 30 a 37*

Como uma última tentativa de melhorar o rendimento da oleuropeína, até então insatisfatório, decidiu-se pela adição de um ácido orgânico juntamente com o solvente durante as etapas de extração, a fim de se estabilizar a molécula do componente extraído, para uma melhor quantificação. Como também não foram observadas vantagens na utilização de uma etapa prévia de limpeza da "matéria-prima", este procedimento foi descartado e as folhas micronizadas foram utilizadas sem pré-tratamento. Os ácidos orgânicos escolhidos foram o cítrico (experimentos 30 a 33) e o acético (experimentos 34 a 37), por não serem tóxicos em concentrações adequadas e por já estarem presentes naturalmente em alguns alimentos.

Como o objetivo desses experimentos era verificar se a adição exerceria influência sobre o teor de oleuropeína, e caso afirmativo, qual seria o melhor reagente (ácido cítrico ou acético), optou-se por realizar apenas 1 contato com cada um dos seguintes solventes: **etanol grau alimentício puro** (experimentos 30 e 34), **etanol alimentício contendo 50% de água** (experimentos 31 e 35), **etanol alimentício contendo 30% de água** (experimentos 32 e 36) e **etanol alimentício contendo 20% de água** (experimentos 33 e 37). Em cada extração foram utilizadas aproximadamente 10 g de folhas, 90 g de solvente e 1 g do ácido orgânico. Os solventes permaneceram em contato com as folhas

durante 24 minutos no banho de ultrassom, logo após o sistema foi centrifugado e o conteúdo líquido foi concentrado no rotaevaporador, diluído em água, congelado e conduzido ao liofilizador para a obtenção do extrato seco, para posterior quantificação da oleuropeína.

*j) Experimento 38*

Os resultados obtidos nos experimentos 31 a 37 permitiram concluir que a adição de ácidos orgânicos é vantajosa para melhorar o rendimento da oleuropeína nos extratos. Desta forma, selecionou-se o melhor solvente e o melhor ácido orgânico para a realização de um último experimento com três sucessivas etapas de contato em banho de ultrassom a temperatura ambiente por 35 minutos, sempre se adicionando solvente novo e ácido orgânico em cada etapa, na mesma proporção utilizada nos experimentos 31 a 37. Todos os extratos resultantes foram misturados e preparados para a obtenção do produto seco.

A Tabela 3.1 a seguir apresenta um resumo dos 38 experimentos realizados:

## Tabela 3.1 – Resumo e identificação dos 38 experimentos realizados

| | Meio de extração da clorofila | Extrações | Solventes testados para a extração da oleuropeína | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Dietil eter | clorofórmio | acetona | etanol | 1-propanol | 2-propanol | 30% etanol + 70% água | 50% etanol + 50% água | 70% etanol + 30% água | 80% etanol + 20% água | água |
| **Folhas micronizadas com pré-tratamento para extração prévia da clorofila** | hexano | 1 etapa com agitação manual[a] | E1 | E2 | E3 | | | | | | | | |
| | diclorometano | | | | | E7 | E8 | E9 | | | | | |
| | Hexano + diclorometano | | | | | | | | E13 | E14 | E15 | | |
| | SFE CO2 + etanol | 2 etapas com agitação mecânica[b] | | | | E16 | | | | | | | |
| | | 3 etapas com agitação mecânica | | | | E24 | | | | E25 | | | E26 |
| | | 1 etapa em ultrassom[a] + 2 etapas com agitação mecânica[b] | | | | E27 | | | | E28 | | | E29 |
| | SFE CO2 | 3 etapas em com agitação mecânica[b] | | | | E18 | | | | E19 | | | E20 |
| | | 1 etapa em ultrassom[a] + 2 etapas com agitação mecânica[b] | | | | E21 | | | | E22 | | | E23 |
| | **Ácido orgânico adicionado** | **extrações** | Dietil eter | clorofórmio | acetona | etanol | 1-propanol | 2-propanol | 30% etanol + 70% água | 50% etanol + 50% água | 70% etanol + 30% água | 80% etanol + 20% água | água |
| **Folhas micronizadas sem pré-tratamento** | nenhum | 1 etapa com agitação manual[a] | E4 | E5 | E6 | E10 | E11 | E12 | | | | | |
| | | 2 etapas com agitação mecânica[b] | | | | E17 | | | | | | | |
| | Com ácido cítrico | 1 etapa em ultrassom[a] | | | | E30 | | | | E31 | E32 | E33 | |
| | Com ácido acético | 1 etapa em ultrassom[a] | | | | E34 | | | | E35 | E36 | E37 | |
| | | 3 etapas em ultrassom[a] | | | | | | | | | E38 | | |

[A]Procedimento realizado à temperatura ambiente (aproximadamente 25 ºC); [b]Procedimento realizado à 50 ºC.

### *3.2.4. Análise de oleuropeína nos extratos*

A quantificação da oleuropeína nos extratos foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com relação a um padrão externo (Oleuropeína cat N0 008011, Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltda). Foi utilizada uma coluna NST C18 5µm 250 x 3.0mm (NST), com fase móvel composta por metanol/ácido tricloroacético 0,5% em água (45:55), pH 2,2, fluxo 1,0 ml/min e detector UV a 280 e 320 nm, com volume de injeção de 20 µl. Os extratos líquidos foram concentrados por evaporação a 50° C (quando necessário), e então injetados no cromatógrafo. Os extratos sólidos (~40 mg) foram dissolvidos em 1 ml de metanol/água (1:1) em banho ultrassônico por 15 minutos. A solução foi então centrifugada e o sobrenadante (20 µl) injetado no cromatógrafo. A curva de calibração foi feita com soluções de oleuropeína padrão de concentrações variando entre 0,15 e 0,90 mg/ml.

Todas as análises de oleuropeína nos extratos foram realizadas nas dependências do Laboratório de Cromatografia, localizado no Departamento de Química, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob supervisão da Dra. Vanny Ferraz.

### *3.2.5. Cálculo de rendimentos*

O rendimento global ($X_0$) do processo foi calculado apenas para as amostras que foram liofilizadas. De acordo com a Eq. 1, $X_0$ é obtido através da diferença (em %) entre a massa de folhas utilizada e a massa de extrato liofilizado resultante, com relação a massa de folhas utilizada.

$$X_0 = 100 \times \frac{m_{extrato\ seco}}{m_{folhas}} \qquad (1)$$

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. Caracterização da matéria-prima

### *4.1.1. Teor de oleuropeína nas folhas micronizadas*

Na análise realizada em uma amostra das folhas de oliveira micronizadas (orgânicas e produzidas no Brasil) a uma temperatura de aproximadamente 35º C, foi detectado um teor de apenas 0,3 % de oleuropeína (em massa). Esse resultado é bem inferior ao valor reportado na literatura para plantas cultivadas no solo europeu, com valores entre 60 e 90 mg/g de folha seca (LE TUTOUR; GUEDON, 1992), equivalente a faixa de 6 a 9 % em massa.

Diante do baixo teor de oleuropeína nas folhas, cogitou-se a ocorrência de perda do componente na micronização. Porém, a análise da água proveniente das folhas, coletada durante o processo não detectou a presença de oleuropeína.

### *4.1.2. Resultados da caracterização físico-química e microbiológica*

A Tabela 4.1 a seguir apresenta os resultados para a caracterização das folhas de oliva micronizadas em relação aos teores de cinzas, umidade e pH.

**Tabela 4.1 – Análises físico-químicas**

| Análises | Resultado |
|---|---|
| Cinzas Totais (%) | 5,3 |
| Cinzas Insolúveis (em éter %) | 4,9 |
| pH | 4,9 |
| Umidade (%) | 8,3 |

Os resultados para o teor de cinzas e umidade estão de acordo com os obtidos em alguns trabalhos da literatura. Bahloul et al. (2009) obtiveram um teor de 10 % de umidade em estudos sobre a secagem solar das folhas de oliveira. Boudhrioua et al. (2009) detectaram uma variação de 2,86 a 4,45 % de cinzas totais em folhas de oliva, porém os autores estudaram apenas as folhas frescas.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados das análises microbiológicas das folhas micronizadas.

**Tabela 4.2 – Análises microbiológicas**

| Análises | Resultado | Padrão |
|---|---|---|
| Contagem total de bactérias | $2{,}1 \times 10^3$ UFC/g | $10^5$ UFC/g |
| Enterobactérias | Ausente em 1 g | $10^3$ UFC/g |
| *Escherichia coli* | Ausente em 1 g | Ausente em 1 g |
| Staphylococus aureus | Ausente em 1 g | ----- |
| *Salmonella sp* | Ausente em 10 g | Ausente em 10 g |
| *Pseudomonas sp* | Ausente em 1 g | ----- |
| Contagem total de bolores e leveduras | < 10 UFC/g | $10^4$ UFC/g |

Segundo o laudo emitido pelo laboratório, a amostra está dentro de todos os padrões microbiológicos considerados, segundo a Farmacopéia Britânica – 20002.

## 4.2. Teores de oleuropeína nos extratos

A Tabela 4.3 a seguir apresenta, de forma geral, todos os resultados obtidos nas análises de teor de oleuropeína dos extratos de folhas de oliva, resultantes das extrações realizadas nos 38 experimentos. A Tabela 4.3 também apresenta a codificação dos experimentos (como identificado na Tabela 3.1) e os rendimentos obtidos para os experimentos 21 a 27, nos quais os extratos foram liofilizados antes das análises.

**Tabela 4.3 – Resultados obtidos em relação ao teor de oleuropeína e o rendimento global**

| Código dos experimentos | Estado da amostra | Oleuropeína (g/100g) | Oleuropeína (mg/100mL) | Massa de extrato líquido analisado (g) | Rendimento Global ($X_0$) |
|---|---|---|---|---|---|
| **E1** | líquido | | 1,27 | 0,47 | |
| **E2** | líquido | | 0,61 | 0,66 | |
| **E3** | líquido | | 3,27 | 0,59 | |
| **E4** | líquido | | 0,23 | 1,94 | |
| **E5** | líquido | | 0,09 | 1,84 | |
| **E6** | líquido | | 3,13 | 1,99 | |
| **E7** | líquido | | 0,049 | 4,47 | |
| **E8** | líquido | | 0,003 | 8,14 | |
| **E9** | líquido | | 0,001 | 3,83 | |
| **E10** | líquido | | 0,065 | 4,83 | |
| **E11** | líquido | | 0,012 | 3,45 | |
| **E12** | líquido | | 0,009 | 7,84 | |
| **E13** | líquido | | 0,45 | 11,05 | |
| **E14** | líquido | | 0,81 | 10,62 | |
| **E15** | líquido | | 0,15 | 10,01 | |
| **E16** | líquido | | 0,44 | 10,70 | |
| **E17** | líquido | | 0,48 | 8,17 | |
| **E18** | sólido | 1,67 | | | 2,54 |
| **E19** | sólido | 1,39 | | | 9,85 |
| **E20** | sólido | 0,31 | | | 5,96 |
| **E21** | sólido | 1,75 | | | 2,70 |
| **E22** | sólido | 0,97 | | | 9,90 |
| **E23** | sólido | 0,45 | | | 6,08 |
| **E24** | sólido | 1,79 | | | 2,29 |
| **E25** | sólido | 1,55 | | | 7,96 |
| **E26** | sólido | 1,23 | | | 1,90 |
| **E27** | sólido | 1,45 | | | 2,88 |
| **E28** | sólido | 1,88 | | | 8,47 |
| **E29** | sólido | 0,44 | | | 2,09 |
| **E30** | sólido | 0,21 | | | 4,09 |
| **E31** | sólido | 0,63 | | | 5,07 |
| **E32** | sólido | 0,09 | | | 4,87 |
| **E33** | sólido | 0,29 | | | 4,70 |
| **E34** | sólido | 1,47 | | | 6,19 |
| **E35** | sólido | 1,55 | | | 4,59 |
| **E36** | sólido | 2,17 | | | 7,98 |
| **E37** | sólido | 1,52 | | | 5,50 |
| **E38** | sólido | 4,80 | | | 13,76 |

Como pode ser observado na Tabela 4.3, não se pode fazer uma comparação dos experimentos de forma generalizada, pois algumas amostras foram analisadas na forma líquida, e outras na forma sólida.

Vale ressaltar que, no início do trabalho, o objetivo maior era verificar se era possível obter extratos contendo quantidades detectáveis de oleuropeína, e só então, aprimorar a metodologia. Ainda assim, almejava-se a obtenção de um extrato mais concentrado possível, porém, nem sempre isso foi possível. Nos experimentos 1 a 17, por exemplo, os extratos foram conduzidos para a análise de oleuropeína na forma líquida, sendo que os volumes das amostras obtidas após a concentração em rotaevaporador variaram bastante, devido à diferença entre os pontos de ebulição dos solventes. Cogitou-se complementar a evaporação em estufa à vácuo, entretanto, na ocasião da realização dos experimentos 1 a 12, este equipamento estava com problemas, não sendo possível utilizá-lo. Posteriormente, durante a realização dos experimentos 13 a 15, a situação se inverteu, e o rotaevaporador teve problemas, e por isso, a concentração dos solventes nesses experimentos foi realizado apenas em estufa à vácuo (já em funcionamento) a 50 ºC. Tomou-se o cuidado de não utilizar temperaturas mais elevadas na secagem para que não houvesse risco de degradação da oleuropeína.

Mesmo não sendo possível fazer uma comparação quantitativa adequada nos experimentos 1 a 17, algumas conclusões em relação às etapas prévias de redução do teor de clorofila foram obtidas. Verificou-se que os extratos com maiores teores de oleuropeína foram obtidos com a acetona (E3 e E6), sendo que a concentração foi um pouco maior no experimento E3, no qual foi feito o pré-tratamento das folhas com hexano. Para os solventes dietil éter (E1 e E4) e clorofórmio (E2 e E5), notou-se que ao se extrair a clorofila das folhas (E1 e E2), a concentração de oleuropeína tornou-se maior, mostrando, portanto, que o tratamento prévio com o solvente hexano foi importante para o aumento do rendimento de oleuropeína nos extratos obtidos. De fato, a oleuropeína tem uma característica polar, e desta forma, possui maior afinidade

pela acetona (também polar), em relação ao dietil éter e o clorofórmio, que são apolares. Vale ressaltar que também foi realizada uma análise nos extratos hexânicos obtidos da etapa de remoção da clorofila, tendo sido verificada uma concentração não maior do que 0,0002 mg/100mL.

Em relação aos solventes alcoólicos etanol (E7 e E10), 1-propanol (E8 e E11) e 2-propanol (E9 e E12), verificou-se que as concentrações de oleuropeína foram muito baixas em relação aos experimentos E1 a E6. Observou-se também que nos experimentos nos quais não foram feitos os pré-tratamentos com o diclorometano (E10, E11 e E12), os valores de oleuropeína foram um pouco maiores. Ainda assim, a diferença é pouco significativa e as concentrações de oleuropeína ainda são muito baixas. Na análise feita no extrato de diclorometano, foi detectado um teor de oleuropeína de até 0,0107 mg/100 mL, ou seja bem maior do que os obtidos nos experimentos anteriores. A escolha deste solvente para a remoção da clorofila foi baseada em um trabalho da literatura (MYLONAKI et al., 2008), porém, no presente trabalho, este não se mostrou adequado, uma vez que além da clorofila, também extraiu quantidades significativas de oleuropeína.

Para os experimentos usando soluções hidroalcoólicas como solvente (E13, E14 e E15), não foram feitos testes sem a etapa de redução da clorofila e, portanto, não foi possível fazer uma comparação neste aspecto. Como descrito no item c da seção 3.2.4, o diclorometano ainda foi utilizado (juntamente com hexano) para a remoção da clorofila, pois na ocasião, a análise da oleuropeína no solvente oriundo desta etapa do processo dos experimentos E7 a E12 ainda não havia sido realizada. Ainda assim, pode-se concluir que, a solução contendo etanol + água na razão 1:1 forneceu o melhor resultado (0,81 mg/100mL), indicando que a presença da água favorece a solubilização da oleuropeína. Porém, não se sabe a quantidade perdida do componente no processo de extração da clorofila, pois nestes experimentos, esta análise não foi realizada.

Comparando-se agora os experimentos 16 e 17, verifica-se que a remoção dos compostos apolares das folhas com $CO_2$ supercrítico (E16) não trouxe vantagens em relação ao aumento do rendimento da oleuropeína nos extratos. Também é possível observar que a extração com o etanol, feita em duas etapas nestes 2 experimentos, também resultou em extratos com teores de oleuropeína menores do que 1 % (em massa). Xynos et al. (2012) conseguiram obter um extrato de folhas de oliva contendo surpreendentes 30 % de oleuropeína, utilizando $CO_2$ supercrítico e 20 % etanol como co-solvente. No entanto, os autores relatam que esta quantidade de co-solvente é muito elevada, e que a utilização da extração supercrítica apenas com $CO_2$ (para a remoção apenas dos compostos apolares), associada a uma extração com fluido pressurizado (etanol, água ou etanol contendo 40 % de água), proporcionou resultados ainda melhores, com extratos contendo 44 % de oleuropeína.

Dos experimentos E18 ao E38, as amostras foram liofilizadas, sendo que os teores de oleuropeína nos extratos secos puderam ser expressos em % em massa, facilitando a comparação dos resultados.

Com os excelentes resultados apresentados por Xynos et al. (2012), decidiu-se por manter o $CO_2$ supercrítico para a "limpeza" da matéria-prima, realizando algumas modificações nos procedimentos de extração da oleuropeína utilizados nos experimentos anteriores. Vale ressaltar que não foi detectada a presença de oleuropeína nos produtos arrastados pelo $CO_2$ supercrítico, indicando que não houve perdas do componente, independente das folhas terem sido umedecidas com etanol ou não.

A Figura 4.1 faz uma comparação entre os resultados dos experimentos nos quais as folhas umedecidas com etanol e limpas com $CO_2$ supercrítico foram utilizadas para a extração da oleuropeína com etanol puro, etanol com 50 % de água e água pura em 3 etapas: de E24 a 26, estas foram conduzidas por agitação mecânica a 50 ºC por 1 hora para cada etapa; de E27

a E29, a primeira etapa foi substituída por uma extração em banho de ultrassom, à temperatura ambiente (~ 25ºC), por 24 minutos.

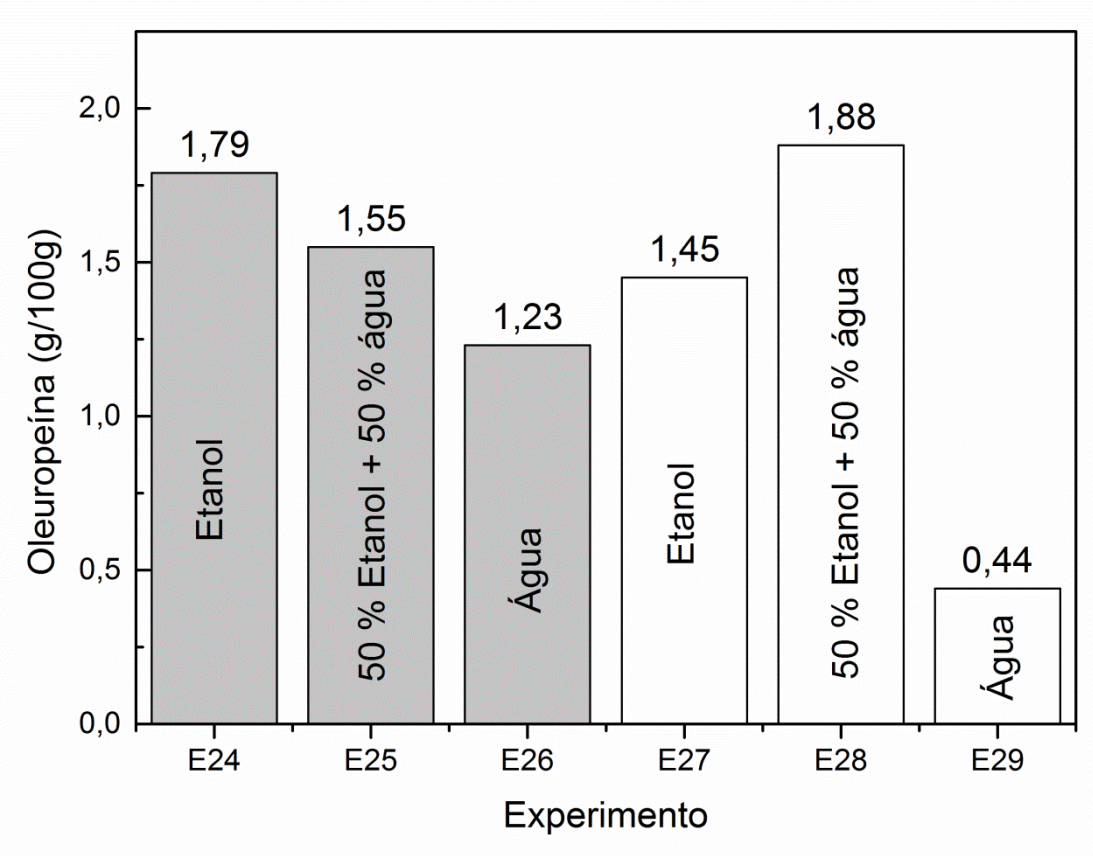


**Figura 4.1 – Comparação entre os experimentos E24 a E29: ☐ 3 etapas de extração com agitação mecânica; ☐ 1 etapa de extração em ultrassom + 2 etapas com agitação mecânica.**

Pela Figura 4.1, observa-se que, nos experimentos E24 a E26, houve uma queda no teor de oleuropeína em função do aumento do teor de água no solvente. Já para os experimentos E27 a E29, não foi observada esta tendência. Nota-se também que a utilização do ultrassom na primeira etapa de extração só foi vantajosa quando para a solução etanol (50 %) + água (50 %) (E28), que resultou no maior teor de oleuropeína entre este grupo de experimentos, além do maior rendimento global (8,47 gramas de extrato/ gramas de folha).

A Figura 4.2 traz a comparação entre os resultados dos experimentos 18 a 23, análogos aos discutidos na Figura 4.1, porém sem o umedecimento das folhas com etanol no procedimento de limpeza com $CO_2$ supercrítico.

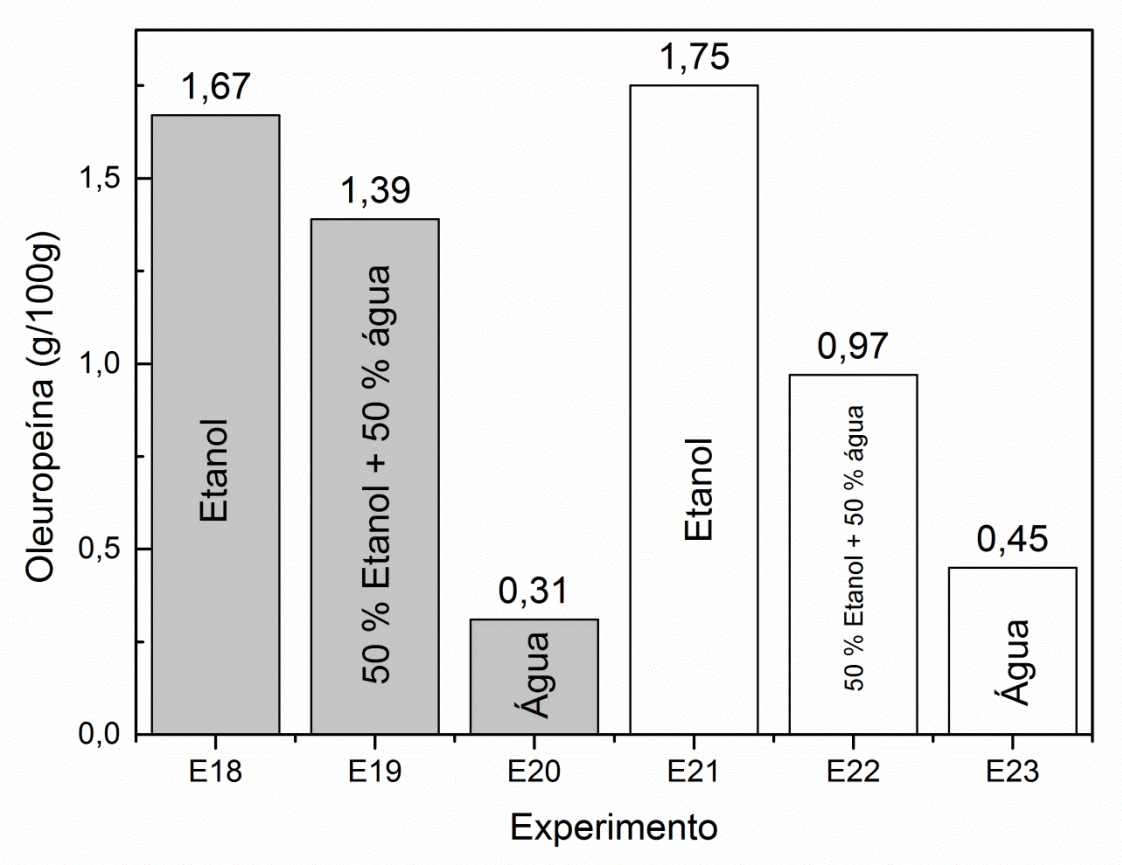


**Figura 4.2 – Comparação entre os experimentos E18 a E23: ▣ 3 etapas de extração com agitação mecânica; ☐ 1 etapa de extração em ultrassom + 2 etapas com agitação mecânica.**

Nos experimentos comparados na Figura 4.2, observa-se que, para os dois procedimentos de extração, houve uma queda no teor de oleuropeína em função do aumento do teor de água no solvente. Ao contrário do observado nos experimentos 24 a 29, a utilização do ultrassom só não foi vantajosa para a extração com solução hidroalcoólica contendo 50 % de água (E22), em comparação com o experimento 19. Neste grupo de experimentos, E18 a E23, os melhores resultados foram obtidos para a extração com etanol puro (E18 e

E21), apesar destes terem originado os menores rendimentos globais neste conjunto (2,54 e 2,70 gramas de extrato/ gramas de folha, respectivamente).

A Figura 4.3 abaixo faz uma comparação entre os resultados dos experimentos nos quais as 3 etapas de extração foram realizadas com agitação mecânica, sem o umedecimento das folhas com etanol no procedimento de limpeza com $CO_2$ supercrítico (E18 a E20) e com o umedecimento das folhas com etanol (E24 a E26).

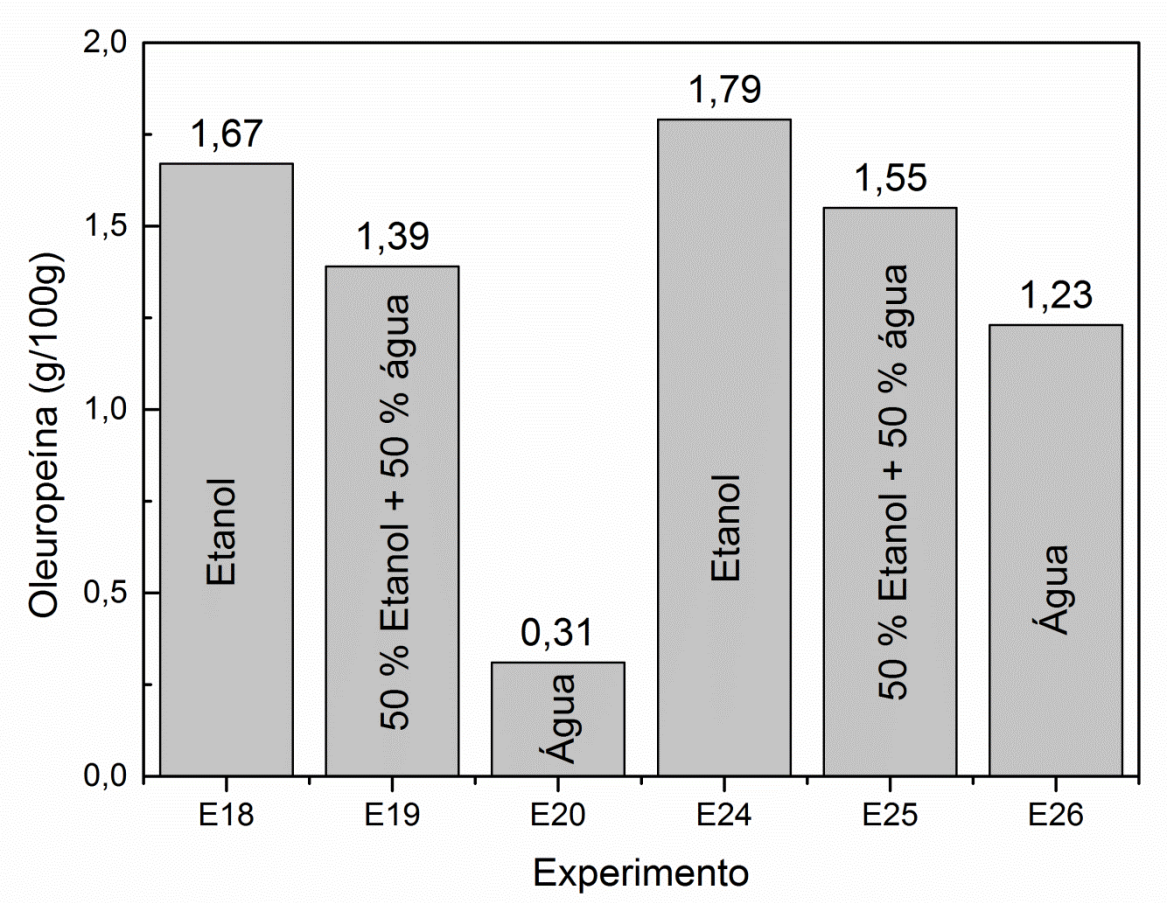


**Figura 4.3 – Comparação entre os experimentos E18 a E20 e E24 a E26.**

Nota-se pela Figura 4.3 que as amostras que foram umedecidas com etanol durante a etapa de limpeza com $CO_2$ supercrítico (E24 a E26),

resultaram em extratos com maiores teores de oleuropeína (principalmente para a água), apesar de menores valores para o rendimento global. Provavelmente, a quantidade de etanol utilizada durante o processo supercrítico auxiliou a remoção dos compostos apolares, aumentando, portanto, o rendimento da oleuropeína nos extratos.

Analogamente, a Figura 4.4 compara os resultados dos experimentos nos quais as extrações foram realizadas com 1 etapa em ultrassom e 2 etapas em agitação mecânica, sem o umedecimento das folhas com etanol no procedimento de limpeza com $CO_2$ supercrítico (E21 a E23) e com o umedecimento das folhas com etanol (E27 a E29).

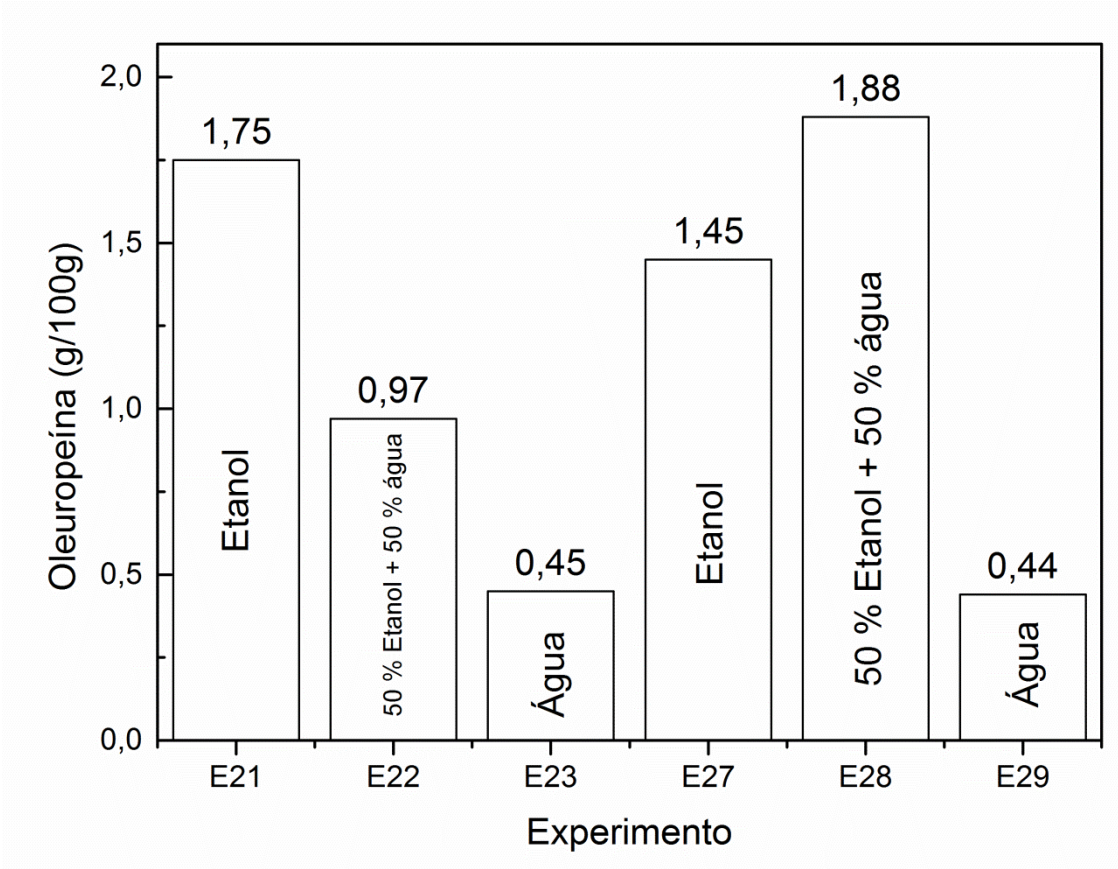


**Figura 4.4 – Comparação entre os experimentos E21 a E23 e E27 a E29.**

Pela Figura 4.4, observa-se que, das amostras que foram umedecidas com etanol durante a etapa de limpeza com $CO_2$ supercrítico (E27 a E29), apenas o experimento E28 apresentou maior teor de oleuropeína em relação ao seu análogo sem o umedecimento das folhas (E22).

Como pode ser observado, os teores de oleuropeína quantificados nos extratos obtidos dos experimentos E18 a E29 estavam bem aquém dos valores obtidos por Xynos et al. (2012). De fato, o equipamento utilizado pelos autores para a etapa de limpeza da matéria-prima era mais sofisticado do que o utilizado no presente trabalho, sendo que o co-solvente etanol foi inserido no sistema via bombeamento, com contínuo reciclo do solvente. O procedimento de extração da oleuropeína também foi realizado com fluidos pressurizados, o que pode ter auxiliado na remoção do componente.

Como já ressaltado, o objetivo do presente trabalho não era a obtenção de extratos ricos em oleuropeína através da reprodução de experimentos da literatura, mas sim obter uma metodologia simples de extração que proporcionasse bons resultados. Desta forma, nos experimentos E30 a E38, a dispendiosa etapa de extração prévia da clorofila foi abolida do procedimento experimental. Para estes últimos experimentos, decidiu-se testar a adição de ácidos orgânicos (cítrico e acético) juntamente com os solventes durante o procedimento de extração da oleuropeína. Segundo Kajdzanoska, Petreska e Stefova (2011), o uso de ácido acético aumenta a obtenção de compostos fenólicos durante a extração dos mesmos com solventes.

A Figura 4.5 apresenta a comparação entre os resultados obtidos para os experimentos E30 a E33, nos quais se utilizou o ácido cítrico como aditivo, e seus análogos E34 a E37, nos quais se utilizou o ácido acético. Nestes experimentos também foram utilizados 4 níveis de água no solvente, para fins de comparação.

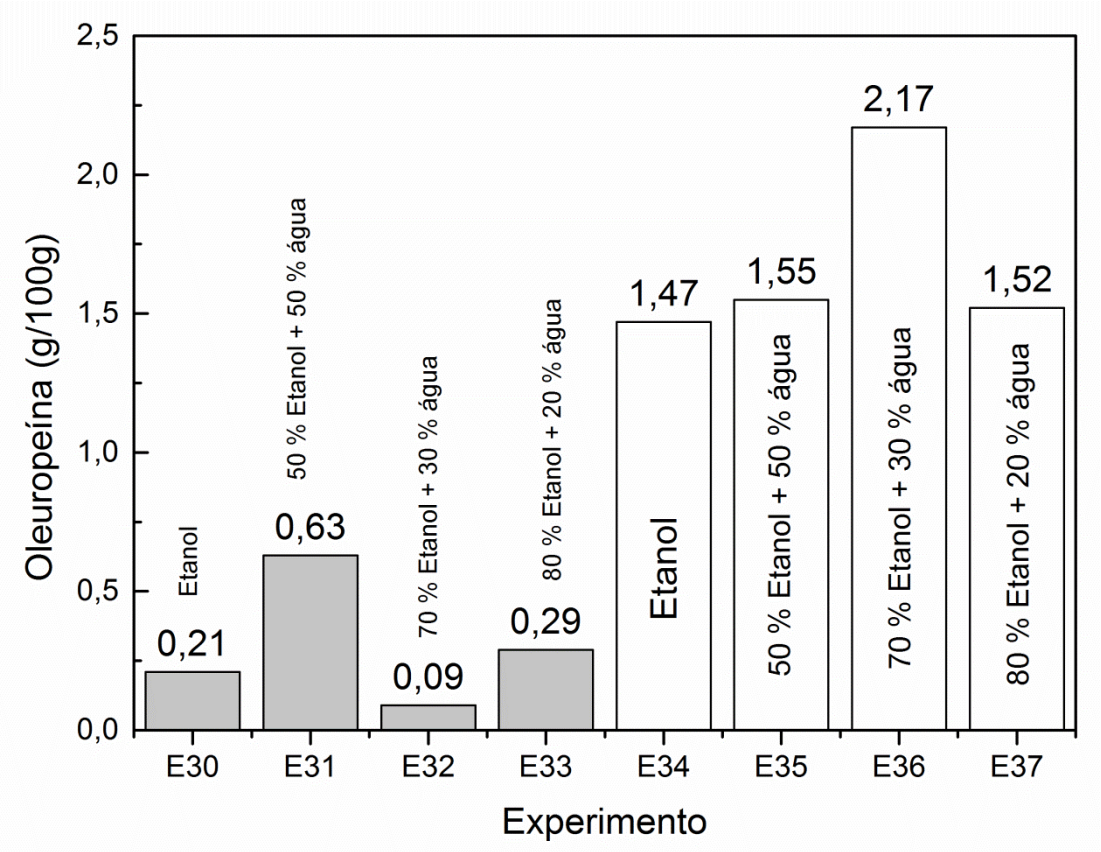


**Figura 4.5 – Comparação entre os experimentos E30 a E37: ☐ adição de ácido cítrico; ☐ adição de ácido acético.**

Como pode ser observado na Figura 4.5, a utilização do ácido acético (E34 a E37) proporcionou resultados muito melhores do que os obtidos para os experimentos com ácido cítrico (E30 a E33). Observou-se ainda que o solvente hidroalcoólico contendo 30 % de água, resultou em um teor de oleuropeína igual a 2,17 %, muito próximo ao obtido por Japón-Luján, Luque-Rodríguez e Luque de Castro (2006a), que obtiveram um teor igual a 2,3 %, utilizando extração dinâmica em ultrassom com solvente hidroalcoólico (etanol com 50 % de água). De fato, o ácido acético, que também foi utilizado em um trabalho prévio sobre a extração de compostos fenólicos de morangos (KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA, 2011), pode ter estabilizado a molécula de oleuropeína, impedindo sua hidrólise e, consequentemente, a formação de outros compostos. No entanto, essa afirmação não pode ser comprovada, pois apenas a oleuropeína foi quantificada nos extratos obtidos.

Os resultados obtidos nos experimentos E34 a E37 permitiram a seleção dos parâmetros para a realização de um último experimento (E38), com etanol contendo 30 % de água e adição de ácido acético, porém promovendo 3 etapas de contato com o solvente novo, sempre readicionando o ácido. A análise do extrato seco obtido neste experimento E38 resultou em um teor de oleuropeína igual a 4,8 %, que foi considerado excelente, uma vez que é mais que o dobro do valor obtido por Japón-Luján et al. (2006a), utilizando o mesmo método de extração. Este experimento também está associado ao maior rendimento global obtido dentre todos os 38 ensaios (13,76 %). Acredita-se que as condições estabelecidas no experimento E38 ainda podem ser aprimoradas para a obtenção de um extrato mais enriquecido, porém, não houve tempo hábil para novos testes nos quais parâmetros como tempo de extração e a temperatura, por exemplo, pudessem ser variados.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, vários procedimentos foram testados a fim de se obter extratos de folhas de oliveira ricos em oleuropeína. Os experimentos foram conduzidos de forma exploratória, baseando-se em algumas condições de processo já adotadas em trabalhos anteriores, disponíveis na literatura.

Alguns problemas experimentais ocorridos nos primeiros experimentos, e que não permitiram a obtenção de um extrato sólido, dificultaram a comparação entre todos os experimentos realizados. Ainda assim, verificou-se que a etapa prévia de remoção de clorofila usando solventes orgânicos não foi vantajosa, visto que não houve melhora significativa nos teores de oleuropeína nos extratos. Além disso, a quantidade de solventes (hexano e diclorometano) utilizada foi muito elevada, tornando o processo antiecológico. Ressalta-se ainda que esses solventes podem deixar resíduos, o que inviabilizaria a utilização dos extratos para fins alimentícios, por exemplo.

O uso da extração supercrítica com $CO_2$, como etapa prévia para a extração com os solventes alcoólicos, forneceu resultados promissores (teores de oleuropeína de até 1,88 %), embora inferiores aos reportados na literatura. Esta etapa, porém, demanda um tempo elevado de processo (em torno de 4 ou 5 horas) e um alto consumo de $CO_2$, o que eleva o custo do procedimento de extração.

A adição de ácido acético em soluções hidroalcoólicas, aliados à extração em banho de ultrassom, proporcionou a obtenção de extratos com até 2,17 % de oleuropeína (em apenas 1 estágio de extração), sendo que o melhor solvente foi a mistura de etanol e água, na proporção 70:30, em massa. O último experimento realizado com esse solvente e com a adição do ácido orgânico, em 3 etapas de extração em ultrassom, resultou em um extrato com 4,8 % de oleuropeína, mais do que o dobro do valor encontrado na literatura, utilizando o mesmo método.

Como apenas a oleuropeína foi monitorada nos extratos obtidos, não foi possível concluir, com precisão, se houve hidrólise da mesma, formando outros componentes, como o hidroxitirosol, por exemplo. Porém, acredita-se que a adição do ácido aos sistemas de extração tenha dificultado essa reação de hidrólise (que normalmente ocorre em meio alcalino) e, consequentemente, estabilizado a molécula de oleuropeína.

Ainda assim, as condições obtidas neste trabalho podem ser um ponto de partida para a otimização de um processo simples e rápido, a fim de se obter um extrato ainda mais rico em oleuropeína, e que possa ter aplicabilidade nas indústrias de alimentos ou farmacêutica.

# 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nesta dissertação de mestrado, os experimentos foram conduzidos de forma exploratória, visando à obtenção de uma metodologia que permitisse a obtenção de um extrato rico em oleuropeína. Os resultados obtidos nos experimentos finais deram um indicativo de que a adição de ácidos orgânicos e o uso da extração com ultrassom podem fornecer bons rendimentos.

Desta forma, para trabalhos futuros sobre a extração da oleuropeína, sugere-se um estudo das variáveis de processo de forma planejada, objetivando-se uma otimização do processo. Estudos poderão ser conduzidos variando-se, concomitantemente, a concentração de água no solvente, a temperatura do processo, a rotação na agitação, o tempo de extração, aplicação de ultrassom e a adição de ácidos orgânicos. O número de etapas de extração e, consequentemente, a quantidade de solvente, também podem ser otimizados.

Outro aspecto que pode ser estudado é a atividade antioxidade dos extratos obtidos, além de estudos sobre sua função antimicrobiana e anti-inflamatória.

A composição dos extratos em relação a outros componentes também pode ser mais bem explorada, uma vez que muitos outros importantes compostos bioativos estão presentes nas folhas de oliveira. Outros compostos, como por exemplo, o hidroxitirosol, também podem ser formados durante o processo de extração, através da hidrólise da oleuropeína, e por isso, a quantificação do mesmo nos extratos também deve ser realizada.

## REFERÊNCIAS

A.O.C.S. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Press, 3rd ed. Champaign, v. 1-2, 1998.

ABAZA, L. et al. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a tunisian gerboui olive leaf extract. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 71, p.1306–1312, 2007.

AL-AZZAWIE, H. F.; ALHAMDANI, M. S. S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v. 78, p. 1371–1377, 2006.

ALUPULUI, A. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **U.P.B. Science Bulletin**, Series B 74(2), 2012.

AMIOT, M. J.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. J. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. **Phytochemistry**, v. 28, p. 67–69, 1989.

ANDRIKOPOULOS, N.; ANTONOPOULOU, S; KALIORA, A. Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 35, p. 479-484, 2002.

ANSARI, M.; KAZEMIPOURB, M.; FATHIB, S. Development of a Simple Green Extraction Procedure and HPLC Method for Determination of Oleuropein in Olive Leaf Extract Applied to a Multi-Source Comparative Study. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 8, p. 38-47, 2011.

ARANTES, Regina. **Avaliação da acção do pó da folha de oliveira (D-lenolato) em indicadores fisiológicos do murganho**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial) – Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2008.

ASGHARI, J.; ONDRUSCHKA, B.; MAZAHERITEHRANI, M. Extraction of bioactive chemical compounds from the medicinal Asian plants by microwave irradiation. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 495–506, 2011.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436, 2013.

BAHLOUL, N. et al. Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (*Olea europaea L.*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2561–2567, 2009.

BAO, J. et al. Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41. **FEBS letters**, v. 581, p. 2737–2742, 2007.

BENAVENTE-GARCÌA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves. **Food Chemistry**, v. 68, p. 457–462, 2000.

BISIGNANO, G. et al. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 971–974, 1999.

BOUDHRIOUA, N. et al. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 412–419, 2009.

BRIANTE, R. et al. Production of highly purified hydroxytyrosol from Olea europaea leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β-glycosidase. **Journal of Biotechnology**, v. 111, p. 67–77, 2004.

CASTRO-VARGAS, H. I. et al. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava L.*) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 319–324, 2010.

CHIREMBA, C.; ROONEY, L.W.; TRUST, B.J. Microwave-assisted extraction of bound phenolic acids in bran and flour fractions from sorghum and maize cultivars varying in hardness. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, p. 119–128, 2012.

CONI, E. et al. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. **Lipids**, v. 35, p. 45–54, 2000.

CRAVOTTOA, G. et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898–902, 2008.

DE LA PUERTA, R. et al. Effects of olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrergic neurotransmission. **Life Sciences**, v. 69, p. 1213–1222, 2001.

DHOBI, M.; MANDAL, V.; HEMALATHA, S. Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavolignan–silybinin. **Journal of Chemical Metrology**, v. 3, p. 13–23, 2009.

FERREIRA, I. et al. Antioxidant activity and phenolic contents of Olea europaea L. leaves sprayed with different copper formulations. Food Chemistry, v. 103, p. 188–195, 2007.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, v. 15, p. 8813–8826, 2010.

GELMEZA, N.; KINCALA, N. S.; YENERB, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 217–224, 2009.

GOULAS, V. et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. **Molecular Nutrition & Food Research**; v. 53, p 600–608, 2009.

HAMDI, H. K.; CASTELLON, R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton distruptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, p. 769-778, 2005.

HAN, J. et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. **Cytotechnology**. v. 59, p. 45–53, 2009.

HERRERO, M. et al. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67-83, 2013.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. **Food Chemistry**, v. 98, p. 136–148, 2006.

HOWARD, L.; PANDJAITAN, N. Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach. **Journal of Food Science**, v. 73 (3), p. 151–157, 2008.

HUI, T.; GHAFOOR, K.; CHOI, Y.H. Optimization of microwave-assisted extraction of active components from Chinese quince using response surface methodology. **Journal of Korean Society of Applied and Biological Chemistry**, v. 52, p. 694–701, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo, 1985.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 185-191, 2006.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 76-82, 2006a.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 753–759, 2006b.

JIMENEZ, P. et al. Oxidative stability of oils containing olive leaf extracts obtained by pressure, supercritical and solvent-extraction. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 497–505, 2011.

KAJDZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. J. Comparison of Different Extraction Solvent Mixtures for Characterization of Phenolic Compounds in Strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemintry**, v. 59, p. 5272–5278, 2011.

KEFALAS, Panagiotis. Alsyllion Agrokepiou, 73100 Chania, GR. Application Number: EP20060386039. Data de publicação: 06/13/2007.

KLEJDUSA, B. et al. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 763-771, 2009.

LE TUTOUR, B.; GUEDON, D. Antioxidant activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1173–1178, 1992.

LEAL, P. F. et al. Functional properties of spices extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2520–2525, 2003.

LEE-HUANG, S. et al. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 1029–1037, 2003.

LEE-HUANG, S. et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and Hydroxytyrosol: Part I. Integrase Inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, p 872–878, 2007.

LIM, H. N. et al. Three-Component Olive Oil-In-Water High Internal Phase Emulsions Stabilized by Palm Surfactant and Their Moisturizing Properties. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, p. 95–101, 2009.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p 41-47, 2003.

MANNA, C. et al. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 461–466, 2004.

MENENDEZ, J. A. et al. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2- overexpressing breast cancer cells. **BMC Cancer**. v. 7, p. 80, 2007.

MICOL, V. et al. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). **Antiviral Research**, v. 66, p. 129–136, 2005.

MYLONAKI, S. et al. Optimisation of the extraction of olive (Olea europaea) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 977–985, 2008.

PACETTA, F. COSMO. **Oliveira a árvore da vida**. Vida e Consciência Editora, ISBN 978-85-90717, 2007.

PAN, X.; NIU, G.; LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing**, v. 42, p. 129–133, 2003.

PARÉ, J. J. R.; BÉLANGER, J. M. R.; STAFFORD, S. S. Microwave-assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, p. 176–184, 1994.

PEDROSA, Sandra Sofia Simões. **Análise dos componentes do Azeite utilizando Métodos Quimiométricos**. 2010. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Alimentar) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

PEREIRA, A. et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea L. Cv. Cobrançosa*) leaves. **Molecules**, v. 12, p. 1153–1162, 2007.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. **Analytica Chimica Acta**, v. 522 (2), p. 169–177, 2004.

ŞAHIN, S.; BILGIN, M. Study on Oleuropein Extraction from Olive Tree (Olea europaea) Leaves by means of SFE: Comparison of Water and Ethanol as Co-Solvent. **Separation Science and Technology**, v. 47, p. 2391–2398, 2012.

ŞAHIN, S.; BILGIN, M.; DRAMUR, M. U. Investigation of Oleuropein Content in Olive Leaf Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Soxhlet Methods. **Separation Science and Technology**, v. 46, p. 1829–1837, 2011.

SAIJA, A.; UCCELLA, N.; Olive biophenols: functional effects on human well-being. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 357–363, 2001.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 444–452, 2012.

SANTOS, S. A. O. et al. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globules Labill bark. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 71– 79, 2012.

SHEN, J.; SHAO, X. A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383 (6), p. 1003–1008, 2005.

SHU, Y.Y.; KO, M.Y.; CHANG, Y.S. Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. **Microchemical Journal**, 74, 131–139, 2003.

SONI, M. et al. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 903–915, 2006.

STAMATOPOULOS, K. et al. Improvement of oleuropein extractability by optimising steam blanching process as pre-treatment of olive leaf extraction via response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, p. 344–351, 2012.

SUDJANA, A. N. et al. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 461–463, 2009.

VEGGI, Priscilla Carvalho. **Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom**. 2013. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

VISIOLI, F. et al. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v 104, p. 677–684, 2002.

VISIOLI, F; BOGANI, P; GALLI, C. Healthful properties of olive oil minor components, in Olive Oil, **Chemistry and Technology**. Boskou D (Ed.). AOCS Press, Champaign, IL: 2006, p. 173–190.

XYNOS, N. et al. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 89– 93, 2012.

## ANEXOS – Perfis Cromatográficos

A Figura A.1 apresenta os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência, obtidos para os experimentos E1, E2, E4 e E5. A Figura A.2 apresenta os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência, obtidos para os experimentos E3 e E6. O tempo de retenção da oleuropeína nesses experimentos foi de 9,32 minutos.

Nas Figuras A.3 e A.4 estão apresentados os cromatogramas dos experimentos E7 a E9 e E10 a E12, respectivamente. O tempo de retenção da oleuropeína nesses experimentos foi de 14,9 minutos.

A Figura A.5 apresenta os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência, obtidos para os experimentos E13 a E15. O tempo de retenção da oleuropeína nesses experimentos foi de 13,3 minutos.

A Figura A.6 apresenta os resultados obtidos para os experimentos E16 e E17. O tempo de retenção da oleuropeína nesses experimentos foi de 11 minutos.

A Figura A.7 apresenta os resultados obtidos para os experimentos E18, E21, E24 e E27. A Figura A.8 apresenta os resultados obtidos para os experimentos E19, E22, E25 e E28 e a Figura A.9 apresenta os resultados para os experimentos E20, E23, E26 e E29. O tempo de retenção da oleuropeína nesses experimentos foi de 12,3 minutos.

Os cromatogramas dos experimentos E20 a E37 estão apresentados nas Figuras A.10 a A.13. O tempo de retenção da oleuropeína nesses experimentos foi de 13 minutos.

A Figura A.14 apresenta o cromatograma do último experimento, E38, no qual o tempo de retenção da oleuropeína foi de 9,7 minutos.

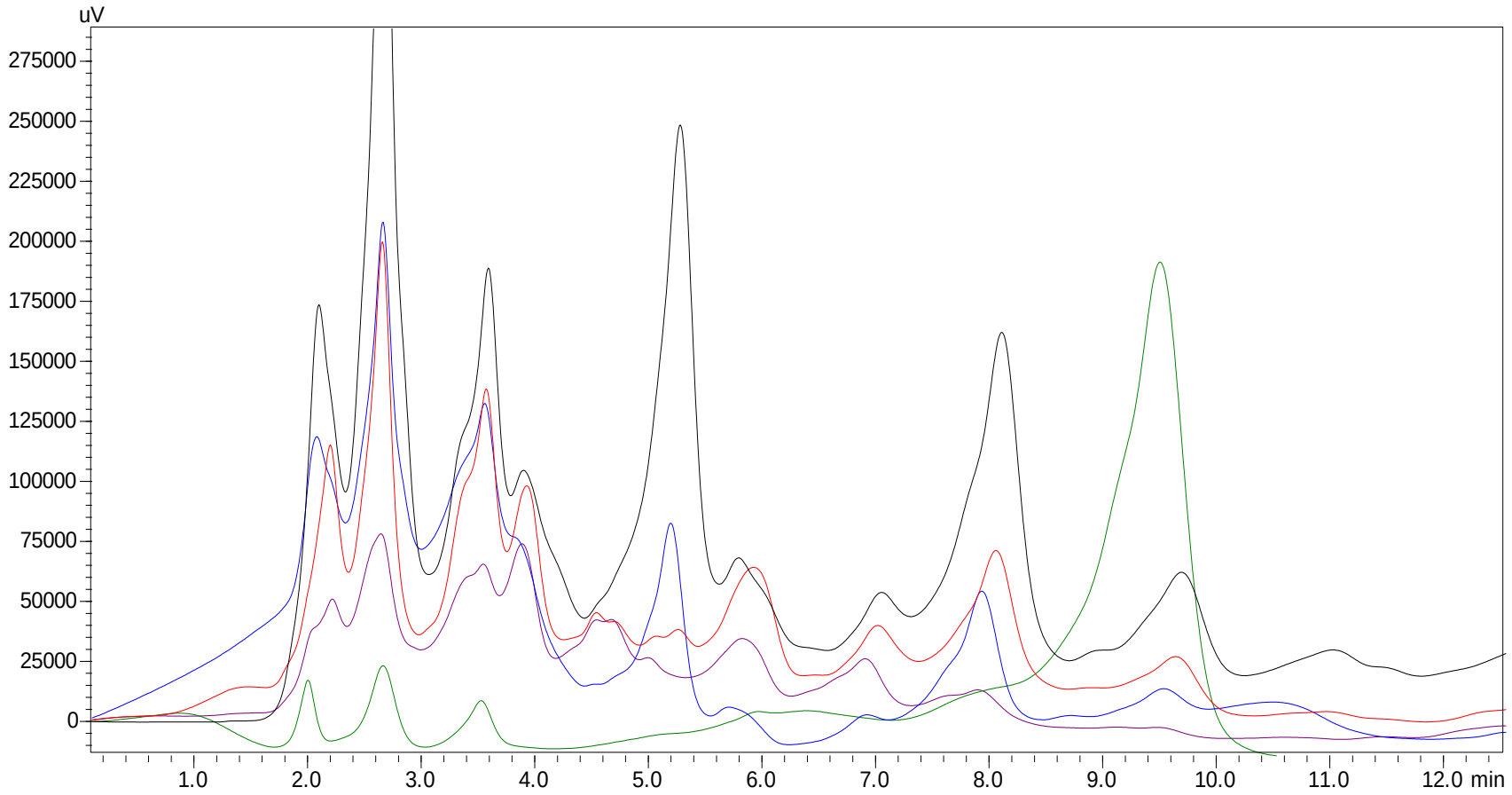


**Figura A.1 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E1 (preto); E2 (vermelho); E4 (azul); E5 (roxo); oleuropeína padrão (verde).**

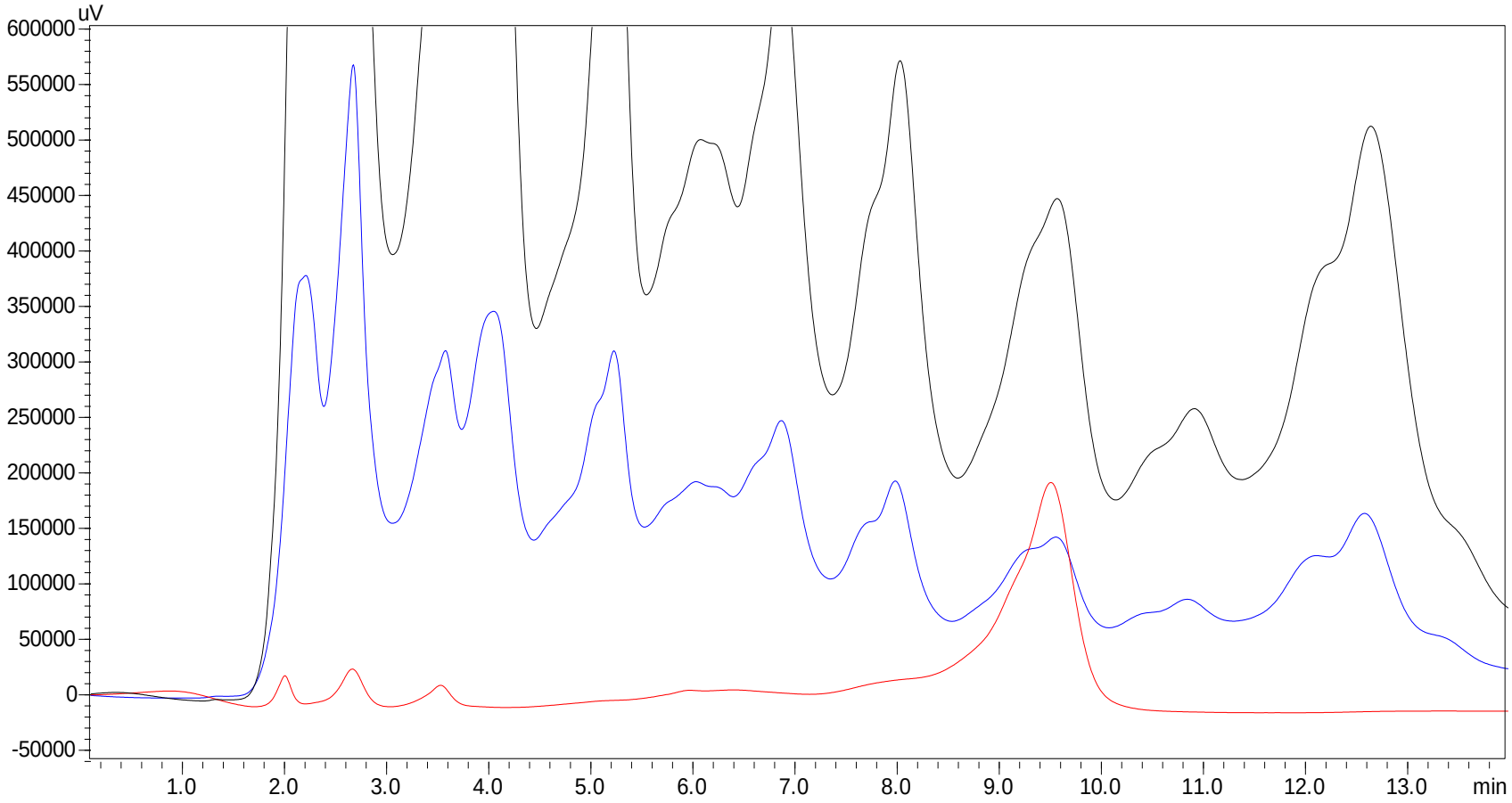


**Figura A.2 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E4 (preto); E6 (azul); oleuropeina padrão (vermelho).**

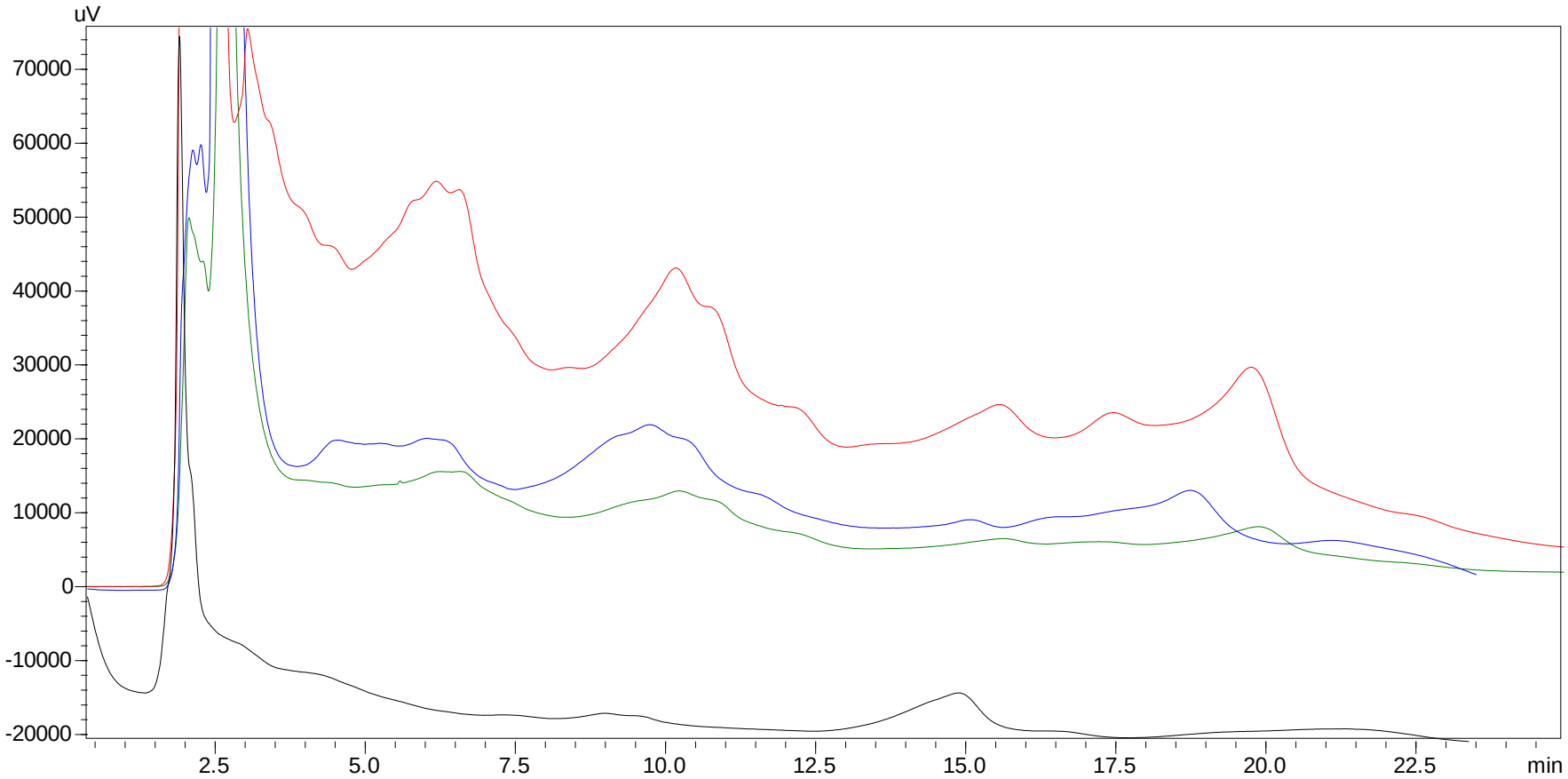


**Figura A.3 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E7 (vermelho); E8 (verde); E9 (azul); oleuropeina padrão 0,1% (preto).**

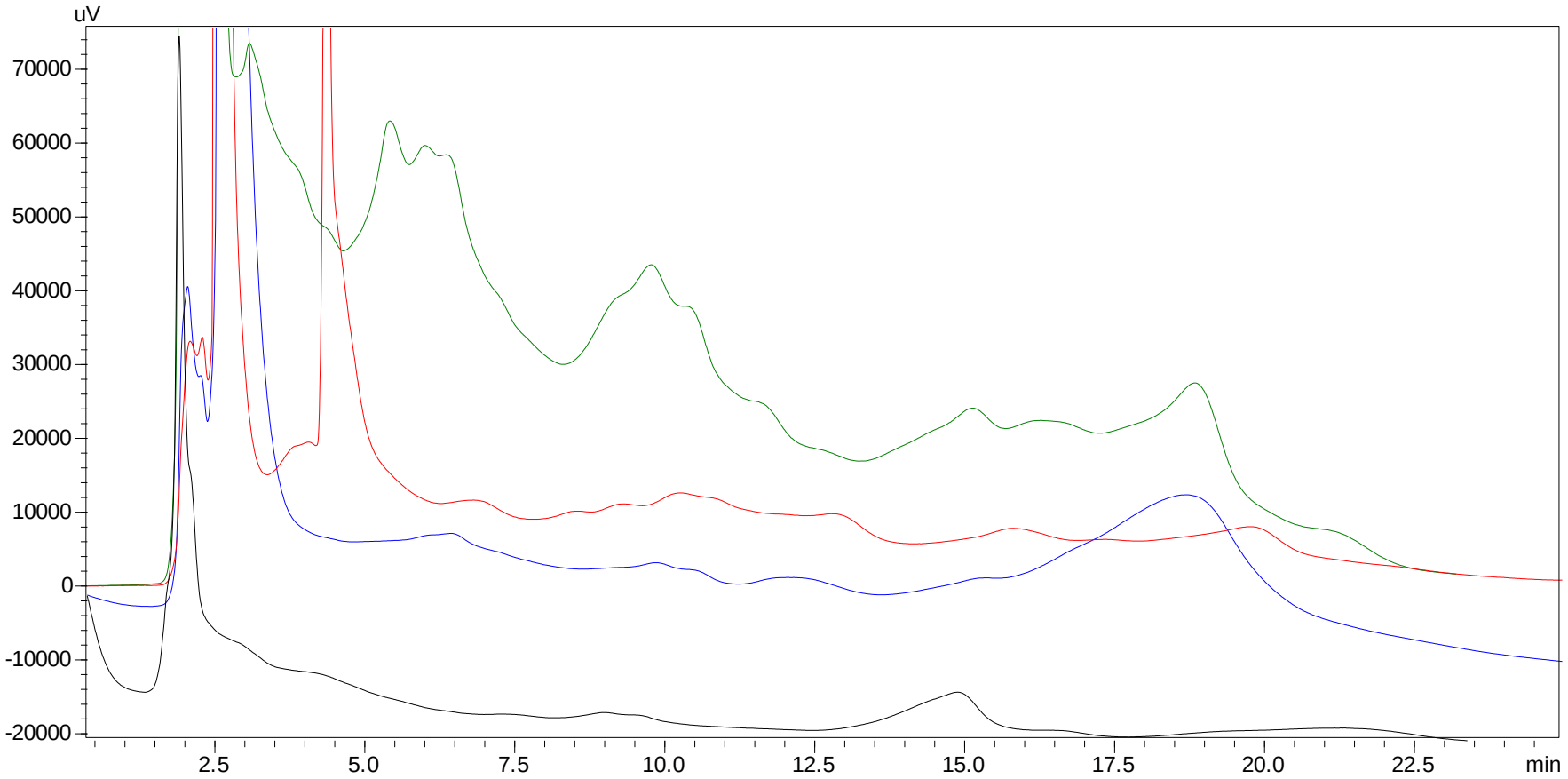


**Figura A.4 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E10 (verde); E11 (azul); E12 (vermelho); oleuropeina padrão 0,1% (preto).**

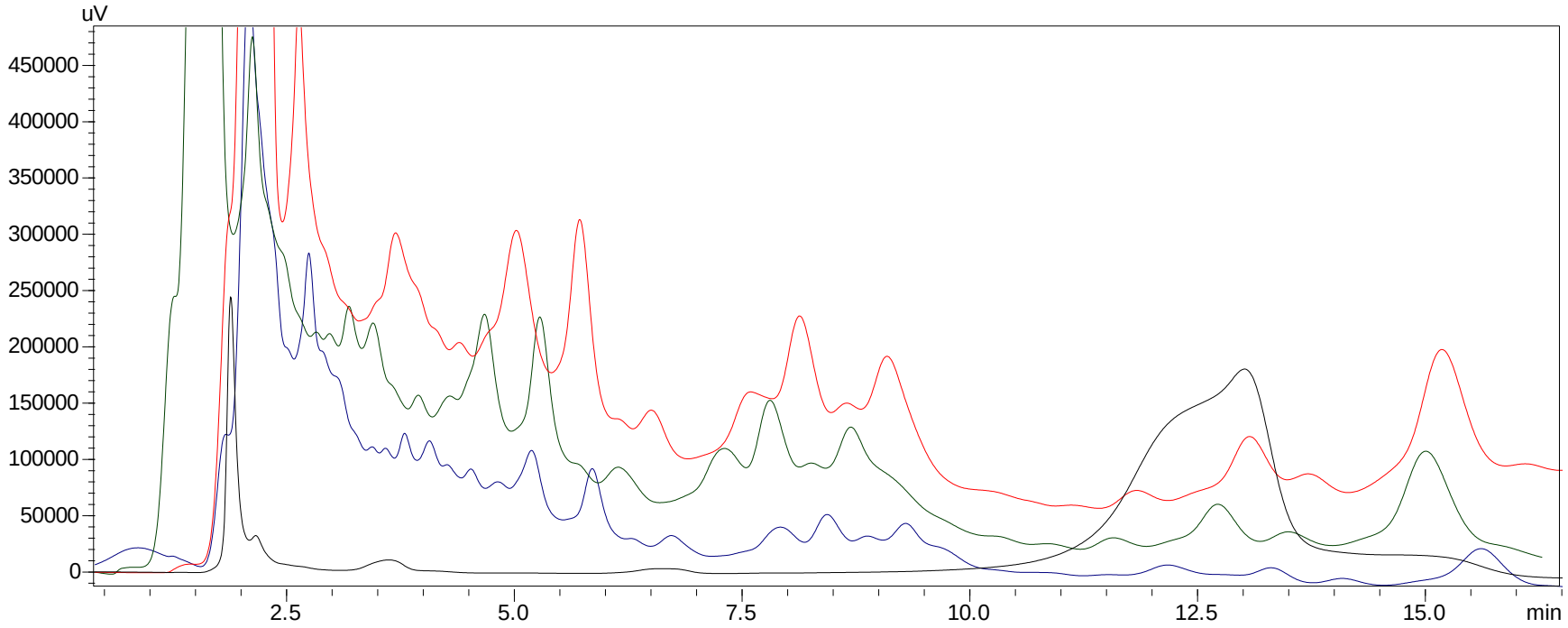


**Figura A.5 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E13 (verde); E14 (azul); E15 (vermelho); oleuropeina padrão 0,2% (preto).**

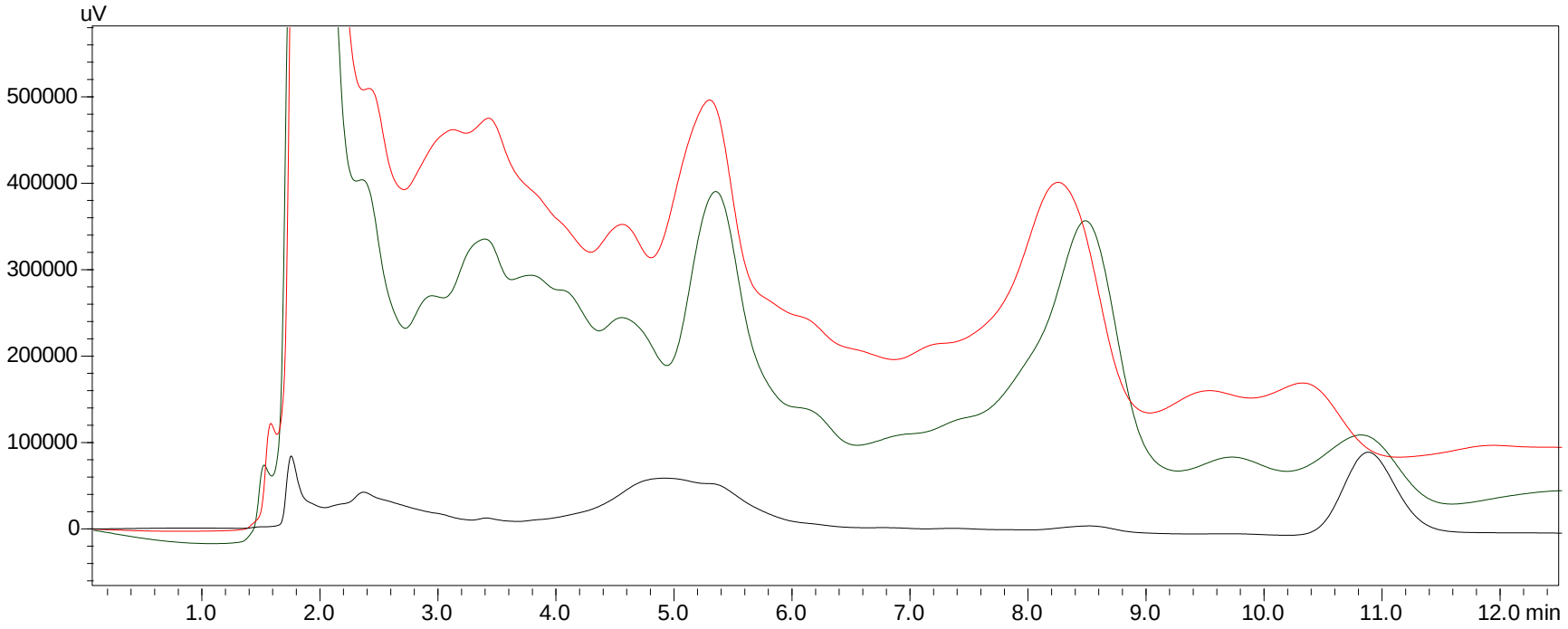


**Figura A.6 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E16 (vermelho); E17 (verde); Oleuropeina padrão 0,5%.**

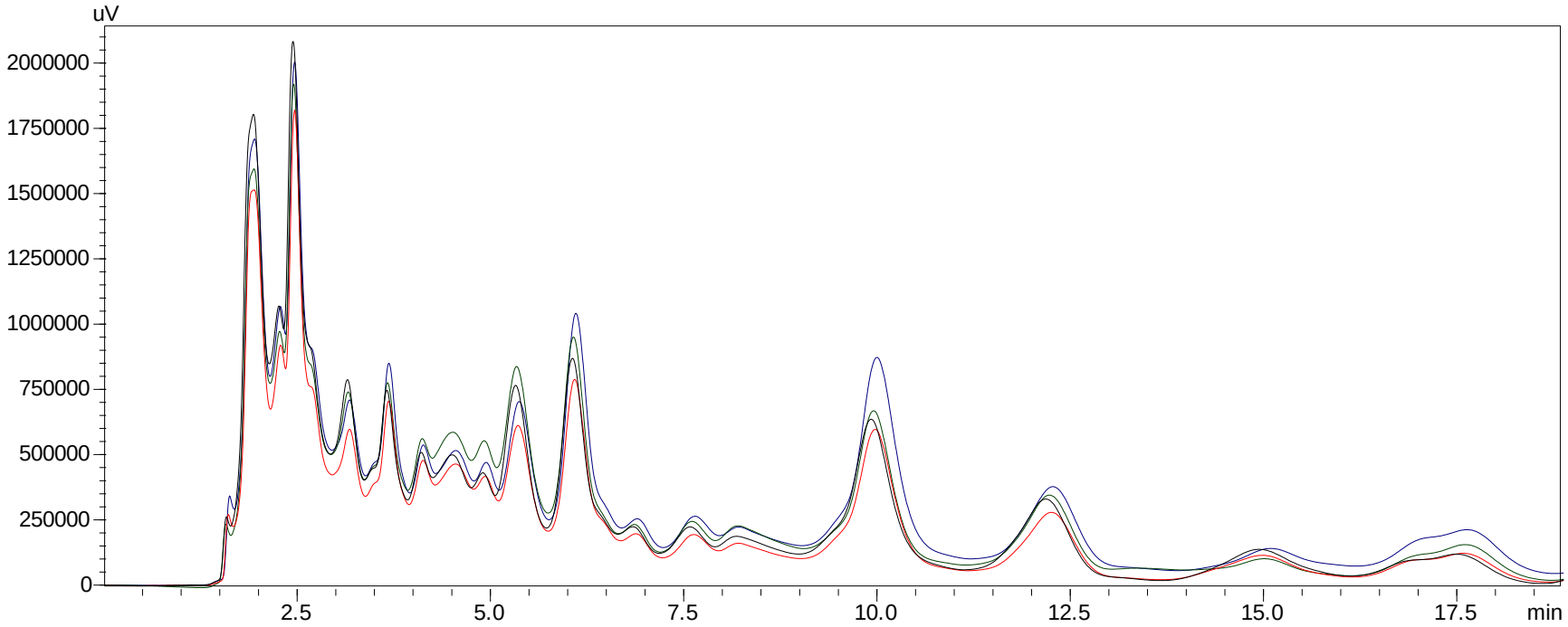


**Figura A.7 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E18 (verde); E21 (verde); E24 (preto); E27 (vermelho).**

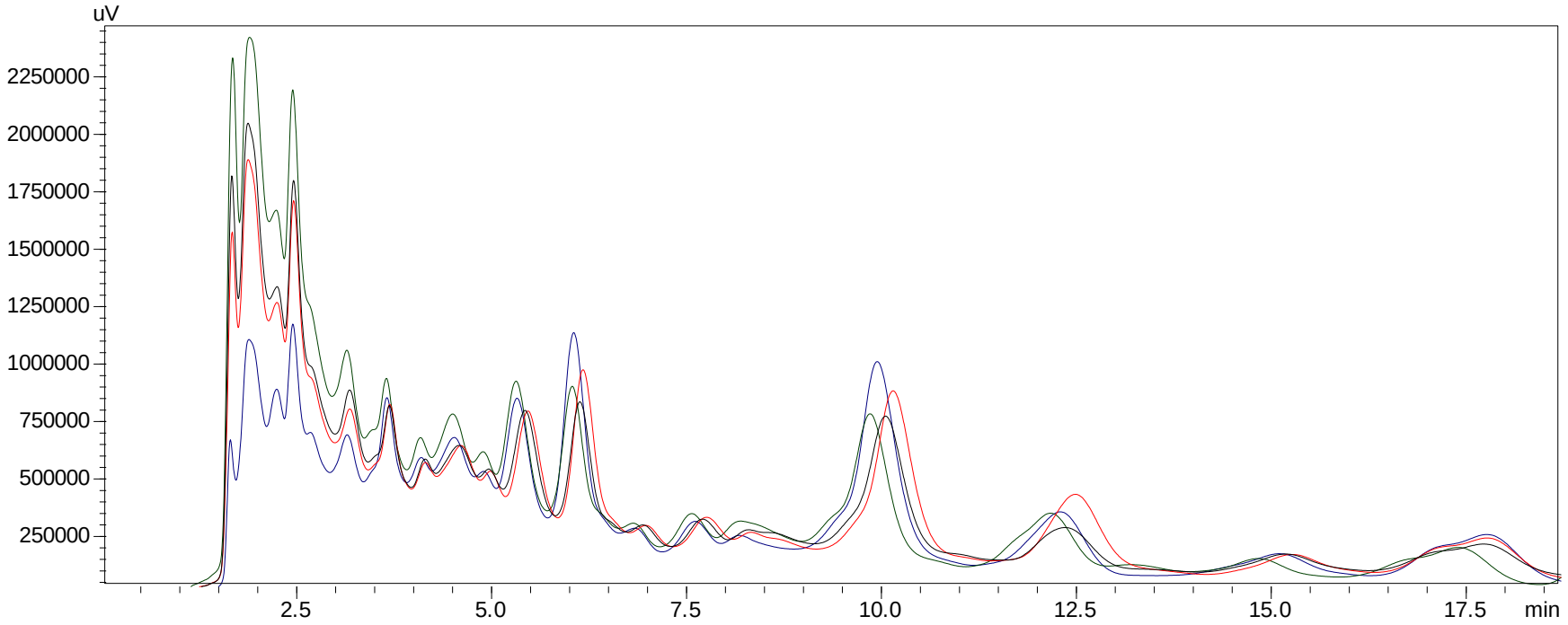


**Figura A.8 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E19 (verde); E22 (preto); E25 (azul); E28 (vermelho).**

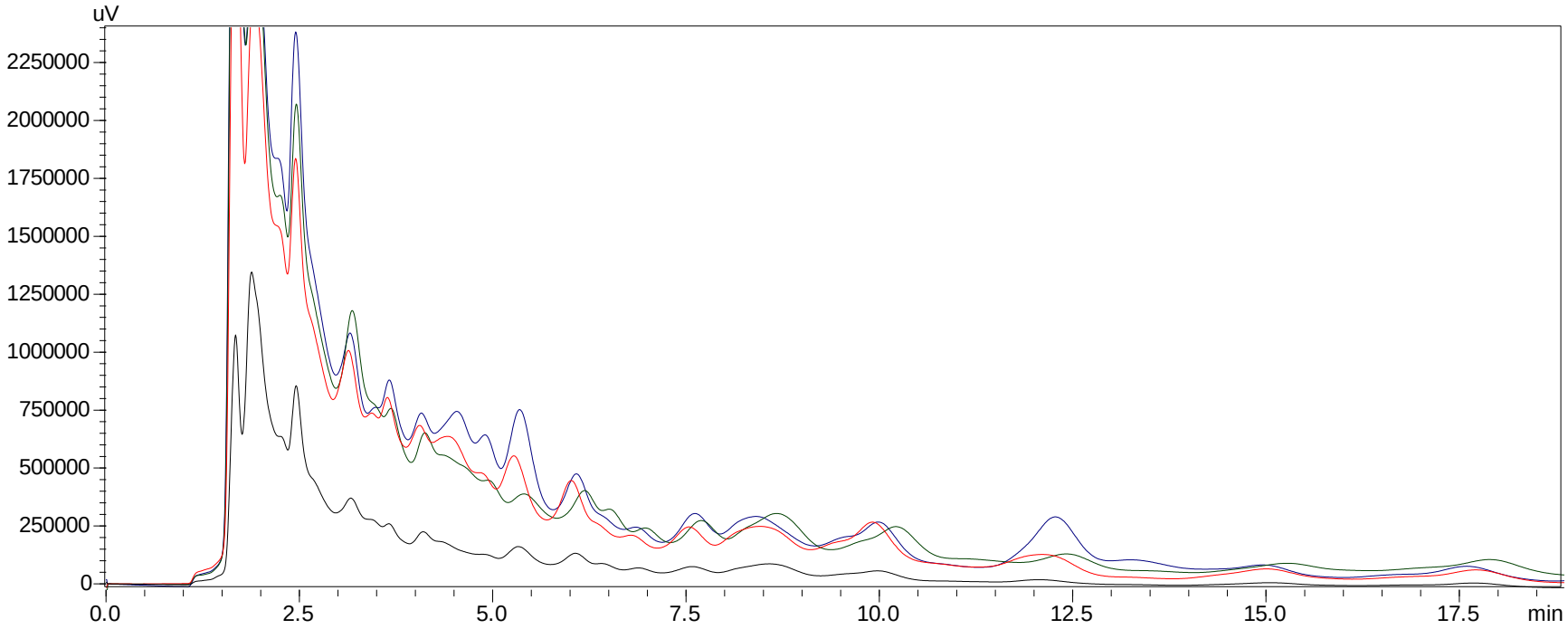


**Figura A.9 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E20 (verde); E23 (preto); E26 (azul); E29 (vermelho).**

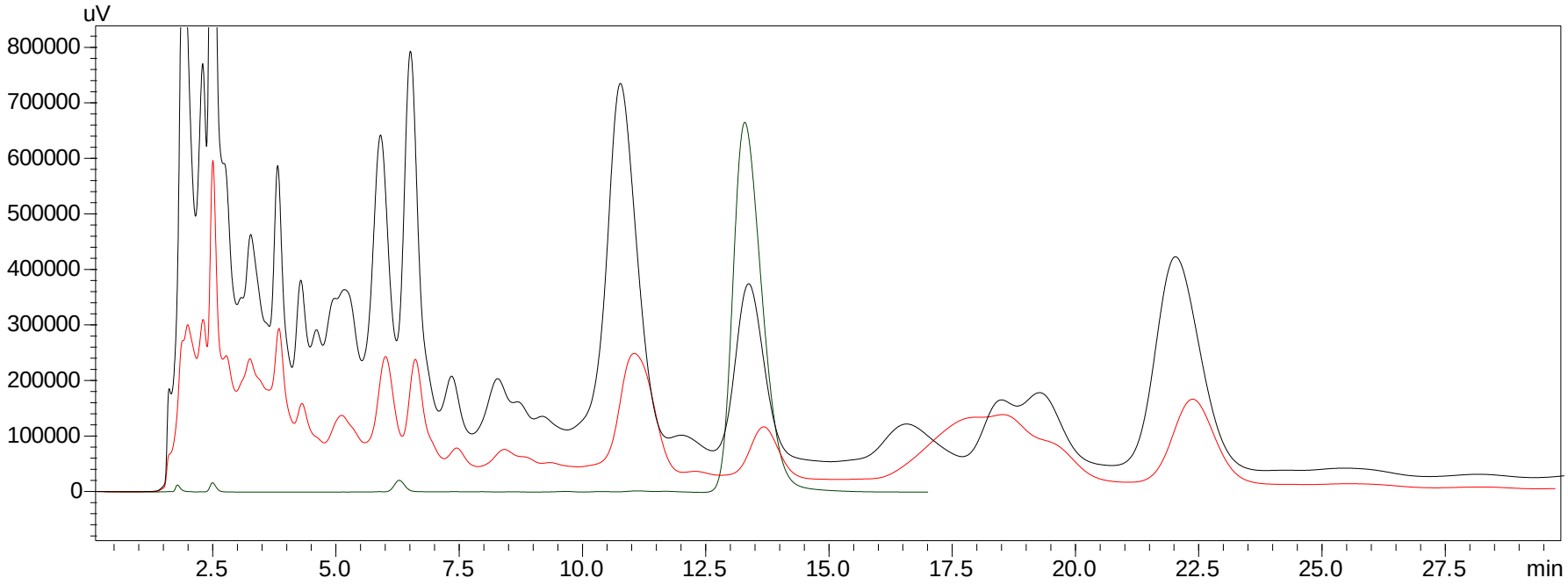


**Figura A.10 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E30 (vermelho) e E34 (preto).**

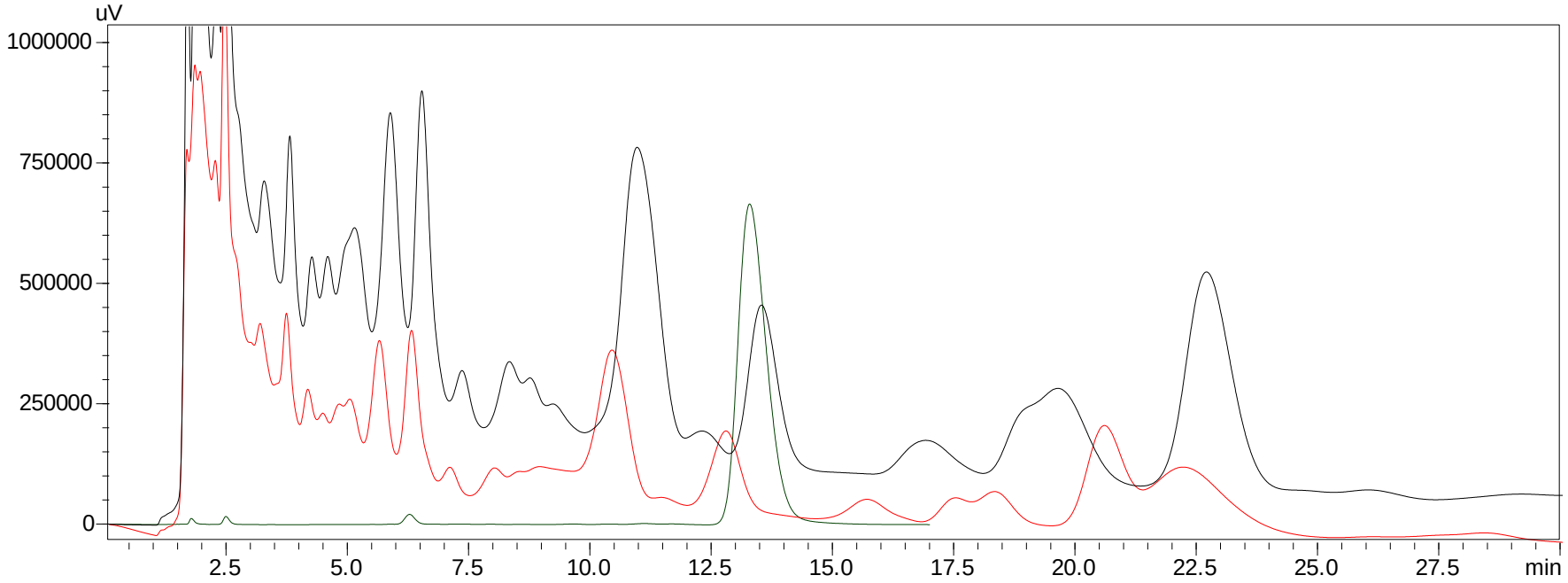


**Figura A.11 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E31 (vermelho) e E35 (preto).**

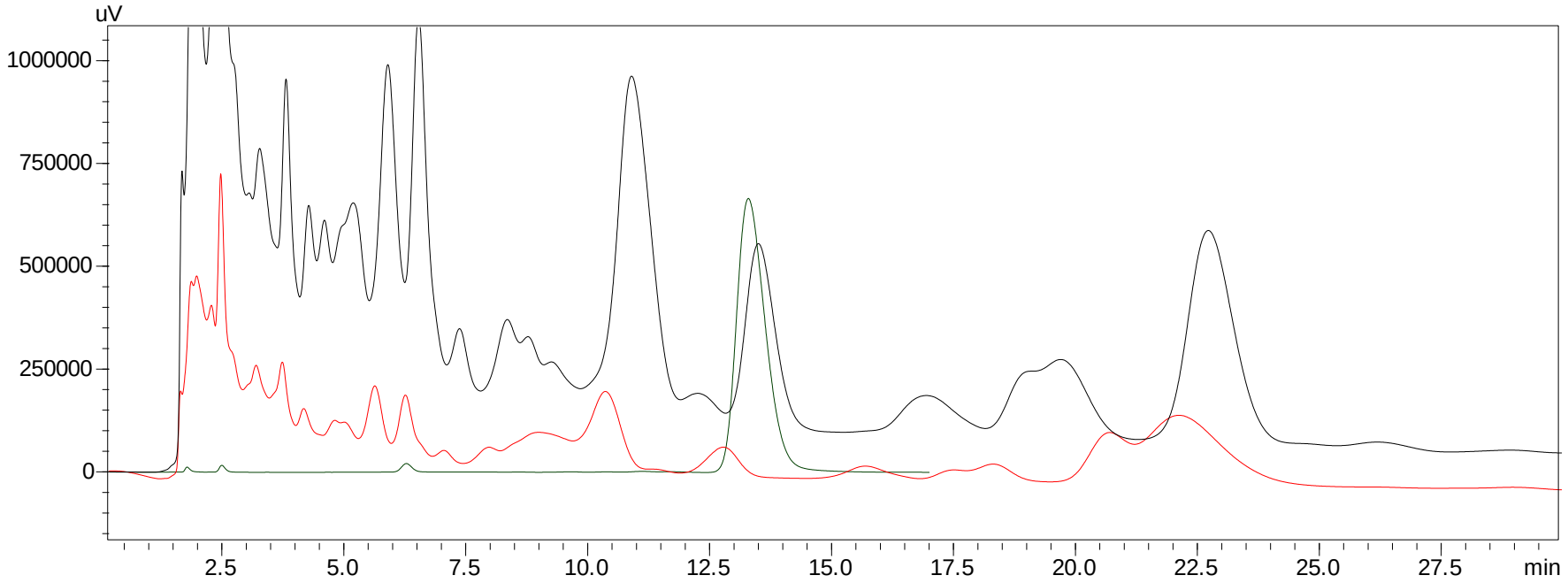


**Figura A.12 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E32 (vermelho) e E36 (preto).**

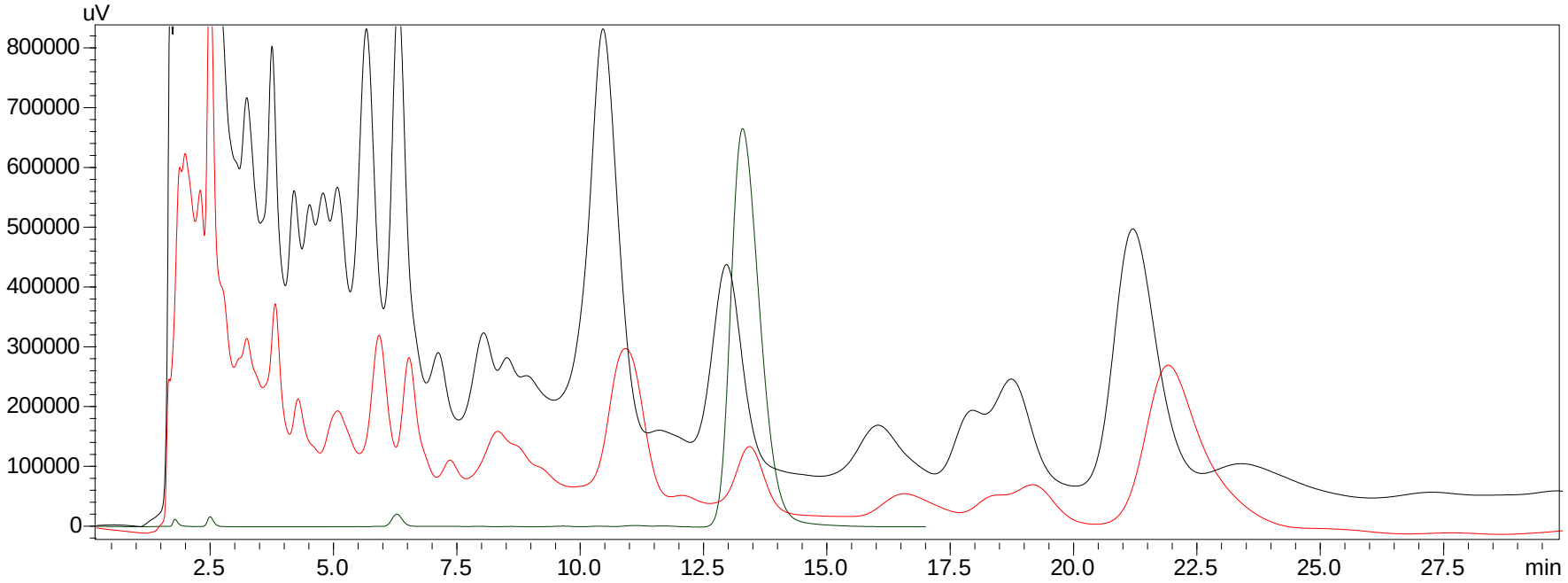


**Figura A.13 – Cromatograma obtido a 280 nm para os experimentos: E33 (vermelho) e E37 (preto).**

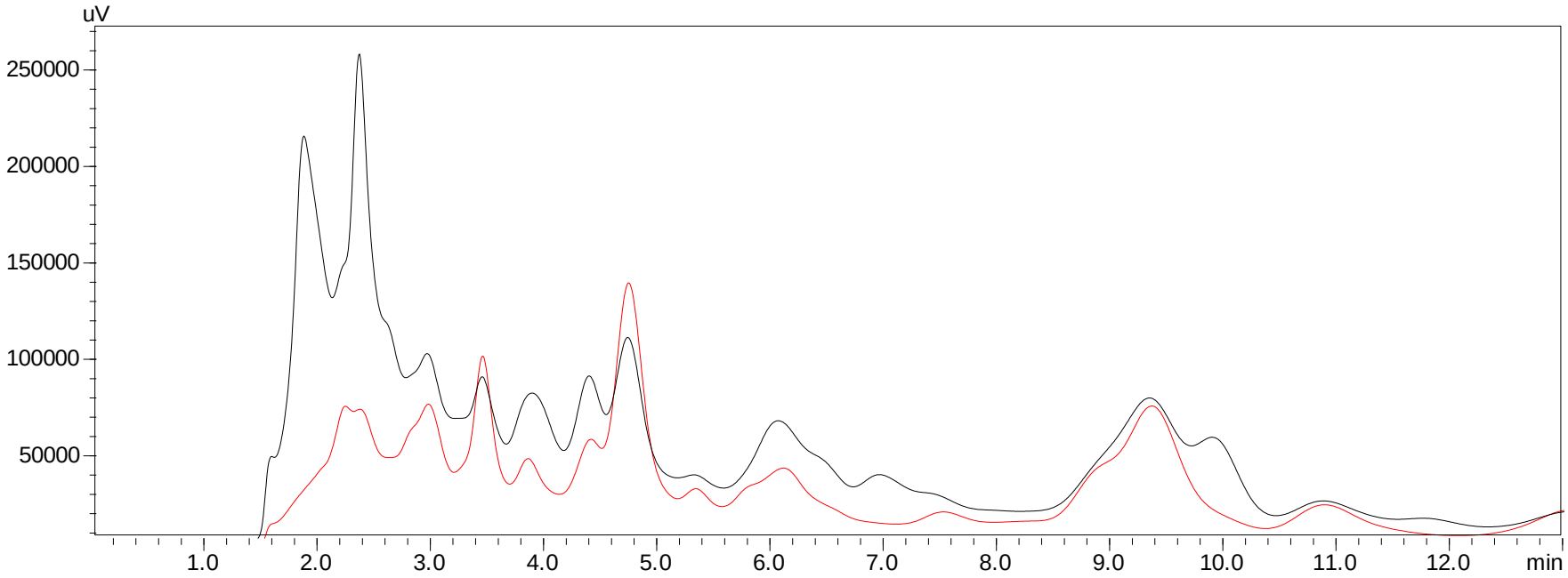


**Figura A.14 – Cromatograma obtido a 280 nm para o experimento E38 (preto).**