

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**JONAS MARCELO JASKI**

**Obtenção de compostos bioativos a partir de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.)**

**Maringá**

**2018**

**JONAS MARCELO JASKI**

**Obtenção de compostos bioativos a partir de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Área de concentração: Produção Vegetal

**Maringá**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

J39o Jaski, Jonas Marcelo  
Obtenção de compostos bioativos a partir de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) / Jonas Marcelo Jaski. -- Maringá, 2018.  
86 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho.  
Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia Regina Schawn-Estrada

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2018.

1. Líquidos pressurizados. 2. Fohas de oliveira. 3. Oleuropeína. 4. Ciclodextrina. 5. Azeite de oliva. I. Cardozo Filho, Lúcio, orient. II. Schawn-Estrada, Kátia Regina, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 634.63

AHS-CRB-9/1065

## FOLHA DE APROVAÇÃO

JONAS MARCELO JASKI

Obtenção de compostos bioativos a partir de folhas de oliveira (*Olea europaea*  
L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr. Lucio Cardozo Filho  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Carlos Eduardo Barão  
Instituto Federal do Paraná

Prof.<sup>a</sup> Dr. Julian Martinez  
Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 20 de fevereiro de 2018.

Local de defesa: Anfiteatro II, Bloco J-45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela força e saúde durante esse período.

Agradeço a minha mãe Suzana, ao meu irmão Jonatan e a minha família que sempre me apoiou e estiveram ao meu lado a todo o momento.

Sou grato aos meus orientadores Professor Lucio Cardozo Filho e Professora Kátia Regina Schawn-Estrada pela oportunidade e pelo aprendizado repassado. Ao Professor Carlos Barão pela ajuda e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho experimental. Ao Professor Luciano Lião pelas análises físico-químicas realizadas durante o trabalho realizado. A professora Katieli Campanholi pela ajuda nas análises de caracterização.

Aos meus colegas de laboratório que contribuíram para realização do trabalho, Roberta Cuco, Michel Santos, Helen Mazzer e Willyan Giufrida. Ao Jean Marinozi que sempre esteve me apoiando e dando forças durante esse período. A todos os meus amigos que de alguma forma colaboraram em momentos difíceis.

Por fim agradeço ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

# Obtenção de compostos bioativos a partir de Folhas de Oliveira (*Olea europaea* L.)

## RESUMO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore frutífera utilizada para fins ornamentais e principalmente para produção de azeitonas e azeite de oliva. Em suas folhas estão presentes componentes essenciais para saúde humana, grande interesse surge no seu elevado conteúdo de polifenóis. Dentre os compostos fenólicos está a oleuropeína, ela apresenta alto poder antioxidante e anti-inflamatório, ação antimicrobiana, antiviral, antitumoral, anticâncer, neuroprotetora, além de efeito benéfico contra doenças cardiovasculares e outros efeitos benéficos para saúde humana bem documentados. Para a extração da oleuropeína várias técnicas têm sido realizadas, porém são escassos os trabalhos que utilizam o processo de extração líquida pressurizada (PLE). Este processo é uma técnica em que se usam solventes líquidos do tipo GRAS a pressões elevadas e temperatura amenas, sendo uma técnica atóxica e de tecnologia limpa. Esta pesquisa propôs-se utilizar o PLE de modo dinâmico diferente dos outros trabalhos já publicados utilizando tecnologia verde para extração de oleuropeína no aproveitamento de folhas de oliveira, utilizando solvente de baixa toxicidade. Buscou-se também o aproveitamento das folhas de oliveira, material que seria descartado durante o processo de extração do azeite de oliva nas agroindústrias, para obtenção de compostos ricos das folhas, beneficiando os produtores e os consumidores de azeite. O teor de compostos fenólicos presentes nos extrato e potencial antioxidante foi determinado por metodologias específicas descritas no texto. O extrato obtido foi microencapsulado em  $\beta$ -ciclodextrina e os complexos foram caracterizados por diferentes técnicas. O extrato e os microencapsulados foram adicionados em azeite de oliva para avaliar a estabilidade oxidativa do azeite. Os resultados mostraram a possibilidade da extração de oleuropeína das folhas de oliveira via PLE de modo contínuo e que a temperatura é o fator determinante para o rendimento dos extratos e para o potencial antioxidante. A adição do extrato em azeite de oliva mostrou aumento da estabilidade oxidativa do azeite.

**Palavras-chave:** Líquidos pressurizados. folhas de oliveira. Oleuropeína. Ciclodextrina. azeite de oliva.

## Obtaining bioactive compounds from Olive Leaves (*Olea europaea* L.)

### ABSTRACT

Olive tree (*Olea europaea* L.) is a fruit tree used for ornamental purposes and mainly for olives and olive oil production. In its leaves are essential components for human health and great interest arises in its high polyphenols content. Among the phenolic compounds is oleuropein, it has high antioxidant and anti-inflammatory power, also has antimicrobial, antiviral, antitumor, anticancer, neuroprotective action, as well as a beneficial effect for cardiovascular diseases and other beneficial effects for human health, all of them well documented. For the extraction of oleuropein several techniques have been performed, but are scarce works using the pressurized liquid extraction (PLE) process. This process is a technique in which liquid solvents of the GRAS type are used at elevated pressures and mild temperatures, being an atoxic technique and clean technology. This research proposes to use the PLE in a dynamic way, different from the other works already published using green technology with low toxicity solvents for oleuropein extraction from olive leaves. Also looking for the use of olive leaves, material that would be discarded during the agroindustrial olive oil extraction process, to obtain rich compounds from the leaves, benefiting the producers and olive oil consumers. The phenolic content compounds present in the extract and antioxidant potential was determined by specific methodologies described in the text. The extract obtained was microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin and these were characterized by different techniques. The extract and the microencapsules were added in olive oil to evaluate the oxidative stability of the olive oil. The results showed the possibility of extracting oleuropein from olive leaves via PLE continuously and that temperature is the determining factor for extracts yield and antioxidant potential. The oleuropein extract addition in olive oil showed an increase in the oxidative stability of olive oil.

**Keywords:** Pressurized liquids; olive leaves; oleuropein; cyclodextrin; olive oil.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes de compostos fenólicos em plantas. ....	7
Tabela 2: Condições operacionais de extração da oleuropeína a partir das folhas e resíduos da olivicultura.....	11
Tabela 3: Fatores e níveis que compõe o planejamento fatorial $2^3$ completo com pontos centrais a serem utilizados na extração de oleuropeína das folhas de oliveira utilizando etanol 99,5°. ....	21
Tabela 4: Caracterização das folhas de oliveira utilizadas nos experimentos, porcentagem em massa seca. ....	30
Tabela 5: Dados de cor de folhas de oliveira utilizadas nos experimentos.....	30
Tabela 6: Rendimento dos extratos obtidos na extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira de acordo com delineamento experimental. ....	34
Tabela 7: Rendimento de oleuropeína nos extratos obtidos na extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira de acordo com delineamento experimental. ....	39
Tabela 8: Componentes fenólicos totais em mg equivalente ácido gálico por gramas de extrato das folhas dos extratos de folhas de oliveira obtidos em diferentes condições de extração com etanol pressurizado.....	42
Tabela 9: Atividade antioxidante expressa em $IC_{50}$ pelo método DPPH, dos extratos de folhas de oliveira obtidos em diferentes condições de extração com etanol pressurizado.....	45
Tabela 10: Estabilidade oxidativa obtida no aparelho Rancimat, de azeite de oliva, com e sem a adição de extrato de oliveira e microencapsulados de extrato de oliveira. EP: extrato de folhas de oliveira puro; MF: Mistura física; MF+CO <sub>2</sub> : Mistura física + CO <sub>2</sub> supercrítico; KN: Kneading; KN + CO <sub>2</sub> : Kneading + CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Componentes fenólicos presente em maior quantidade no extrato de folhas de oliveira.....	8
Figura 2: Estrutura química de oleuropeína..	9
Figura 3: Representação esquemática da estrutura química da $\beta$ -ciclodextrina.....	17
Figura 4: Folhas de oliveira após a secagem em estufa de circulação de ar. ....	19
Figura 5: Esquema do equipamento utilizado para a extração subcrítica de folhas de oliveira. ....	20
Figura 6: Foto do equipamento utilizado nas extrações.....	21
Figura 7: Mistura física de $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de oliveira.....	24
Figura 8: Kneading ou amassamento de $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de oliveira antes da secagem. ....	25
Figura 9: Equipamento supercrítico utilizado na microencapsulação/inclusão dos extratos na $\beta$ -Ciclodextrina. ....	26
Figura 10: Microencapsulados (KN) de $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de oliveira após o processo supercrítico. ....	26
Figura 11: Equipamento Rancimat utilizado nos experimentos de estabilidade oxidativa de azeite de oliva. ....	29
Figura 12: Cinética de extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira em diferentes condições de extração (temperatura, pressão e vazão de solvente). ....	32
Figura 13: Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre o rendimento do extrato das folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado.....	33
Figura 14: Valores preditos <i>versus</i> observados do rendimento da extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira. ....	35
Figura 15: Curva padrão de oleuropeína. ....	36
Figura 16: Cromatograma característico do padrão utilizado. ....	37
Figura 17: Cromatograma da amostra seca extraída nas condições de temperatura de 60°C, pressão de 100 bar e vazão de etanol de 0,5 mL min <sup>-1</sup> . ....	38
Figura 18: Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre o rendimento de oleuropeína nos extratos obtidos por etanol pressurizado.....	39

Figura 19: Valores preditos <i>versus</i> observados do rendimento de oleuropeína (%) nos extratos de folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado. ....	40
Figura 20: Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre fenólicos totais nos extratos obtidos por etanol pressurizado. ....	43
Figura 21: Valores preditos <i>versus</i> observados dos componentes fenólicos totais (mg EAG/g de extrato) dos extratos de folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado. ....	44
Figura 22: Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre a atividade antioxidante nos extratos obtidos por etanol pressurizado. ....	46
Figura 23: Valores preditos <i>versus</i> observados dos antioxidantes (IC <sub>50</sub> ) dos extratos de folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado. ....	47
Figura 24: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato das folhas de oliveira (EP) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	48
Figura 25: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da β-ciclodextrina em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	49
Figura 26: Superposição dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H da β-CD, extrato de oliveira e interações (MF, MF+CO <sub>2</sub> , KN e KN+CO <sub>2</sub> ). ....	50
Figura 27: Espectros de RMN de <sup>1</sup> H das amostras MF e MF+CO <sub>2</sub> , demonstrando o efeito da irradiação seletiva (NOE) do hidrogênio H-5 da β-CD nas amostras MF e MF+CO <sub>2</sub> . Em destaque hidrogênios que tiveram a intensidade aumentada pelo efeito NOE. ....	51
Figura 28: Espectros de RMN de <sup>1</sup> H das amostras KN e KN+CO <sub>2</sub> , demonstrando o efeito da irradiação seletiva (NOE) do hidrogênio H-5 da β-CD nas amostras KN e KN+CO <sub>2</sub> . ....	52
Figura 29: Estrutura da oleuropeína. Em destaque (asterisco) hidrogênios acilcarbinólicos, que possuem deslocamento químico na região de δ 4,3. ....	53
Figura 30: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das substâncias puras (β-Ciclodextrina e extrato das folhas de oliveira) e dos microencapsulados/complexos de β-Ciclodextrina e extrato de folhas de oliveira. ....	54
Figura 31: Espectros na região do infravermelho das substâncias puras (β-Ciclodextrina e extrato das folhas de oliveira) e dos microencapsulados/complexos de β-Ciclodextrina e extrato de folhas de oliveira. ....	55
Figura 32: Gráfico de Difração de Raios X das substâncias puras e das misturas/complexos de inclusão. ....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASE	Extração por solvente Acelerado
ANOVA	Análise de Variância
$A_w$	Atividade Água
CDs	Ciclodextrinas
CER	Taxa de Extração Constante
COSY	Correlações homonucleares
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DCR	Taxa Controlada por Difusão
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRX	Difração de Raios X
EAG	Equivalente Ácido Gálico
EP	Extrato Puro
FER	Taxa de Extração Decrescente
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQS	Correlações heteronucleares
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
KBr	Brometo de potássio
KN	Kneading
KN+CO <sub>2</sub>	Kneading + CO <sub>2</sub> supercrítico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mistura Física
MF+CO <sub>2</sub>	Mistura Física + CO <sub>2</sub> supercrítico
NOE	Efeito nuclear Overhauser
OL	Oleuropeína
P	Pressão

PLE	Extração líquida pressurizada
PSE	Extração por Solvente Pressurizado
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAS	Método Antissolvente Supercrítico
SAE	Extração de Antissolvente Supercrítico
SFE	Extração por Fluido Pressurizado
T	Temperatura
V	Vazão de Solvente
$\alpha$ -CD	Alfa ciclodextrina
$\beta$ -CD	Beta ciclodextrina
$\gamma$ -CD	Gama ciclodextrina

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 Oliveira ( <i>Olea europaea</i> L.).....	4
3.2 Metabólitos secundários .....	5
3.2.1 Compostos fenólicos .....	6
3.2.2 Oleuropeína .....	8
3.3 Azeite de oliva.....	12
3.4 Tecnologia verde.....	13
3.4.1 Extração líquida pressurizada .....	14
3.5 Ciclodextrinas.....	16
3.5.1 Inclusão/microencapsulação com ciclodextrinas .....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1. Matéria prima .....	18
4.2. Caracterização da matéria prima .....	19
4.3 Extração líquida pressurizada de oleuropeína de folhas de oliveira.....	21
4.4 Análise do teor de oleuropeína nos extratos .....	22
4.5 Determinação dos componentes fenólicos totais .....	22
4.6 Análise de antioxidantes DPPH .....	23
4.7 Encapsulação do extrato de folha de oliveira em $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD).....	23
4.7.1 Mistura física (MF) .....	24
4.7.2 Kneading (amassamento) (KN).....	24
4.7.3 CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	25
4.8 Caracterização dos microencapsulados/complexos de Inclusão.....	26
4.8.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	27
4.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
4.10.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) .....	28
4.8.4 Difração de Raios X.....	28
4.9 Aplicação dos Extratos e Microencapsulado em Azeite de Oliva e Avaliação da estabilidade oxidativa em Rancimat .....	28
4.10 Análise estatística .....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29

<b>5.1 Caracterização da matéria prima</b> .....	29
<b>5.2 Rendimento de extrato e oleuropeína</b> .....	32
<b>5.3 Determinação dos componentes fenólicos totais</b> .....	41
<b>5.4 Determinação da Atividade Antioxidante</b> .....	45
<b>5.5 Caracterização dos microencapsulados/complexos de Inclusão</b> .....	48
<b>5.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	48
<b>5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	53
<b>5.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</b> .....	54
<b>5.5.4 Difração de Raios X (DRX)</b> .....	56
<b>5.5 Estabilidade oxidativa em Rancimat</b> .....	58
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
<b>APÊNDICE</b> .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore de importância na produção agrícola e também utilizada na ornamentação. Os frutos da árvore, as azeitonas, são usados para consumo em conserva e também para a extração do azeite de oliva. As suas folhas são descartadas no processo de extração do azeite, no entanto, nelas estão presentes ricas substâncias de interesse para saúde humana. A oleuropeína é o composto fenólico de maior interesse, seus efeitos benéficos para saúde estão bem documentados, sendo a substância majoritária presente nas folhas.

A extração da oleuropeína de forma convencional utiliza solventes altamente tóxicos, gerando limitação para seu uso em alimentos, além de agredir o meio ambiente. Nesse contexto, surge a necessidade de se utilizar extrações mais eficientes e menos agressivas ao meio ambiente. O uso da tecnologia verde é uma potencial alternativa para a extração da oleuropeína, dentro dessa tecnologia está a extração com líquida pressurizada (PLE), uma técnica que utiliza solventes líquidos do tipo GRAS a pressão elevada e temperaturas altas ou amenas (NIETO et al., 2010). Nessa técnica os parâmetros podem ser ajustados para maior seletividade e maior rendimento dos compostos de interesse (PAES et al., 2014).

Na literatura são escassos os trabalhos que usaram PLE para extração de oleuropeína das folhas de oliveira, e os que utilizaram, realizaram o processo de modo estático (XYNOS et al., 2014; LOZANO-SÁNCHEZ et al., 2014; HERRERO et al., 2011). Outros métodos de extração da oleuropeína de folhas de oliveira também já foram estudados (XYNOS et al., 2012; COPPA et al. 2017). No entanto, o presente trabalho possui o diferencial de utilizar a PLE de modo dinâmico, utilizando tecnologia verde para extração de oleuropeína no aproveitamento de folhas de oliveira de variedades cultivadas no Brasil. O estudo também busca o aproveitamento das folhas de oliveira, material que seria descartado durante o processo de extração do azeite de oliva nas agroindústrias, para obtenção de compostos ricos das folhas.

Após a extração, os compostos extraídos muitas vezes perdem seus efeitos rapidamente por serem muito sensíveis aos efeitos do ambiente. Para resolver essa desvantagem existem tecnologias que podem ser empregadas, como a encapsulação desses compostos por substâncias carreadoras que protegem e dosam paulatinamente a ação dos compostos, como as ciclodextrinas. Elas são compostos derivados do amido que possuem capacidade de complexar

outras substâncias, como fármacos e antioxidantes. A inclusão de extratos vegetais com potencial antioxidante nas ciclodextrinas pode ser de grande interesse para posterior aplicação desses complexos em azeite de oliva para o aumento da sua estabilidade oxidativa. Resultados têm demonstrado grande eficiência de ciclodextrinas para formação de microencapsulados em diversos fármacos ou componentes bioativos das plantas (MOURTZINOS et al., 2007; PINHO et al., 2014).

Nesse contexto, a pesquisa foi focada para que posteriormente os produtores de oliveira possam se beneficiar do aproveitamento de um resíduo da extração do azeite de oliva, que são as folhas. A microencapsulação do extrato oriundo das folhas poderá ser utilizado posteriormente para o enriquecimento de alimentos, como é o caso do azeite de oliva, gerando alto valor agregado e proporcionando produtos de alta qualidade para os consumidores. Além disso, será possível o surgimento de uma possível fonte de renda aos produtores, das folhas que atualmente não são comercializadas.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral do trabalho foi a obtenção de extrato das folhas de oliveira utilizando tecnologia verde por etanol pressurizado.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar folhas de oliveira das variedades Arbequina, Koroneiki e Arbosana cultivadas em Águas da Prata - São Paulo;
- Extrair oleuropeína de folhas de oliveira das variedades Arbequina, Koroneikida e Arbosana utilizando etanol pressurizado;
- Determinar a condições de temperatura, pressão e vazão de solvente ótimas para a extração com etanol pressurizado através de curvas cinéticas de rendimento de extrato;
- Determinar o teor de oleuropeína nos extratos obtidos através de técnicas de HPLC;
- Determinar teor de componentes fenólicos totais e antioxidantes nos extratos obtidos;
- Fazer a microncapsulação do extrato obtido em  $\beta$ -Ciclodextrinas;
- Caracterizar os microencapsulados/complexos de inclusão através de técnicas de MEV, RMN, FT-IR e DRX ;
- Avaliar estabilidade oxidativa de azeite de oliva enriquecido com extrato obtido e microencapsulados do extrato por Rancimat.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Oliveira (*Olea europaea* L.)

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família botânica Oleaceae, considerada uma árvore frutífera utilizada para fins ornamentais e principalmente para produção de azeitonas e azeite de oliva (FARES et al. 2011). A provável origem da oliveira é o sul do Cáucaso, planícies altas do Irã e litoral mediterrâneo da Síria e Palestina, depois se expandindo para o restante do Mediterrâneo (TERRAMOTO et al., 2010).

A oliveira é descrita como árvore de porte médio, que apresenta troncos contorcidos, folhas lanceoladas e frutos pequenos (CRUZ et al., 2012). É uma planta que resiste a alterações de temperatura, podendo se adaptar em regiões quentes no verão e frias no inverno (VILLA & OLIVEIRA, 2012). Existem mais de 200 variedades diferentes da espécie no mundo (CABALLERO, 2012). As raízes da oliveira são profundas, podendo atingir até 6 metros de profundidade no solo, dessa forma consegue captar nutrientes em profundidade e resistir a períodos de seca prolongados (ARANTES, 2008).

No Brasil a oliveira foi trazida por imigrantes europeus há muitos séculos. Era cultivada próximo a igrejas e capelas durante o período do Brasil Colônia. Porém, quando a produção aumentou, a família real ordenou o corte das árvores para que não houvesse concorrência com oliveiras de Portugal. Os importadores portugueses também fizeram com que os brasileiros não acreditassem na possibilidade de se produzir bons olivais no Brasil, então por longo período as azeitonas eram oriundas só de Portugal (TERRAMOTO et al., 2010).

Com o tempo a situação mudou e a cultura da oliveira começou a ganhar mais espaço, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Por motivos políticos e falta de especialização, alguns cultivos desapareceram. No entanto, atualmente existe um trabalho embasado em pesquisas, e já se tem o primeiro azeite comercial brasileiro em alguns pontos de venda regionais no Rio Grande do Sul (TERRAMOTO et al., 2010).

As variedades mais cultivadas no Brasil são: Arbequina, Grappolo, Maria da Fé, Arbosana, Koroneiki e Ascolanaentre (VILLA & OLIVEIRA, 2012). Atualmente o Brasil está entre os dez maiores consumidores de azeitona no mundo, sendo o segundo maior importador

de azeitonas de mesa, o que representa grande importância frente ao mercado mundial (CAPPATO; FERREIRA & ROSENTHAL, 2015).

O Conselho Oleícola Internacional define as azeitonas de mesa como os frutos de *O. europaea*, que podem ser de fermentação ou tratamento térmico, com ou sem adição de conservantes. As azeitonas são colhidas em diferentes estágios de maturação e depois são processadas para eliminar o amargor causado pela presença da oleuropeína, que é responsável pelo sabor amargo da azeitona. Quando ocorre a hidrólise da oleuropeína ocorre formação de hidroxitirosol e de ácido elenólico não amargo. A concentração de oleuropeína nos frutos depende de fatores como variedade, irrigação e grau de amadurecimento, pois com o aumento da maturação ocorre diminuição da amargura (BOSKOU, 2015).

Nas folhas a oliveira possui diversos compostos, elas são ricas em secoiridoides, principalmente a oleuropeína, também são presentes os ácidos fenólicos e derivados, principalmente verbascosídeos e ácido caféico, e os flavonóis (apigenina e glicósidos de luteolina) (BOSKOU, 2015). O extrato das folhas de *O. europaea* possuem comprovada ação antioxidante, hipogliceminante, hipotensiva (BENAVENTE-GARCÍA et al, 2000).

### **3.2 Metabólitos secundários**

As plantas produzem diversos componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Os metabólitos secundários não apresentam relações com o crescimento e o desenvolvimento da planta. Os metabólitos secundários possuem outras funções importantes nas plantas, como: proteger contra herbívoros e patógenos; servir como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores; funcionar como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (TAIZ & ZEIGER, 2006).

A importância ecológica que os metabólitos secundários possuem nas plantas provavelmente também tem alguma relação com o potencial efeito medicinal para os seres humanos. Alguns produtos secundários envolvidos no sistema de defesa das plantas, que causam citotoxicidade para patógenos microbianos, podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos. Outros produtos secundários que são envolvidos na defesa contra herbívoros, através de atividade neurotóxica, podem trazer benefícios em seres humanos, como

função antidepressiva, sedativa, relaxante muscular ou anestésico, podendo ter ação no sistema nervoso central (KAUFMAN et al., 1999).

Os metabólitos secundários nas plantas são divididos em três grupos quimicamente diferentes: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (alcaloides) (TAIZ & ZEIGER, 2006). Os metabólitos secundários, que possuem propriedades medicinais relacionadas, são constituídos de ceras, ácidos graxos, terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos (fenóis simples e flavonóides), glicosídeos e fitoesteróis (KASHANI et al. 2012; SARKAR & HOWARTH, 1976).

### ***3.2.1 Compostos fenólicos***

Os compostos fenólicos são originários do metabolismo secundário das plantas, como mencionado anteriormente (TAIZ & ZEIGER, 2006), são multifuncionais, possuem estrutura variável e são substâncias químicas que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Existe uma grande diversidade de compostos fenólicos, cerca de cinco mil, e os mais importantes são: flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI & NACZK, 1995; LEE et al., 2005).

A Tabela 1 mostra as principais classes de combinações fenólicas presentes na natureza e os componentes de suas estruturas. Essas combinações formam grande variedade de compostos, que podem ser chamados de polifenóis (ANGELO & JORGE, 2007).

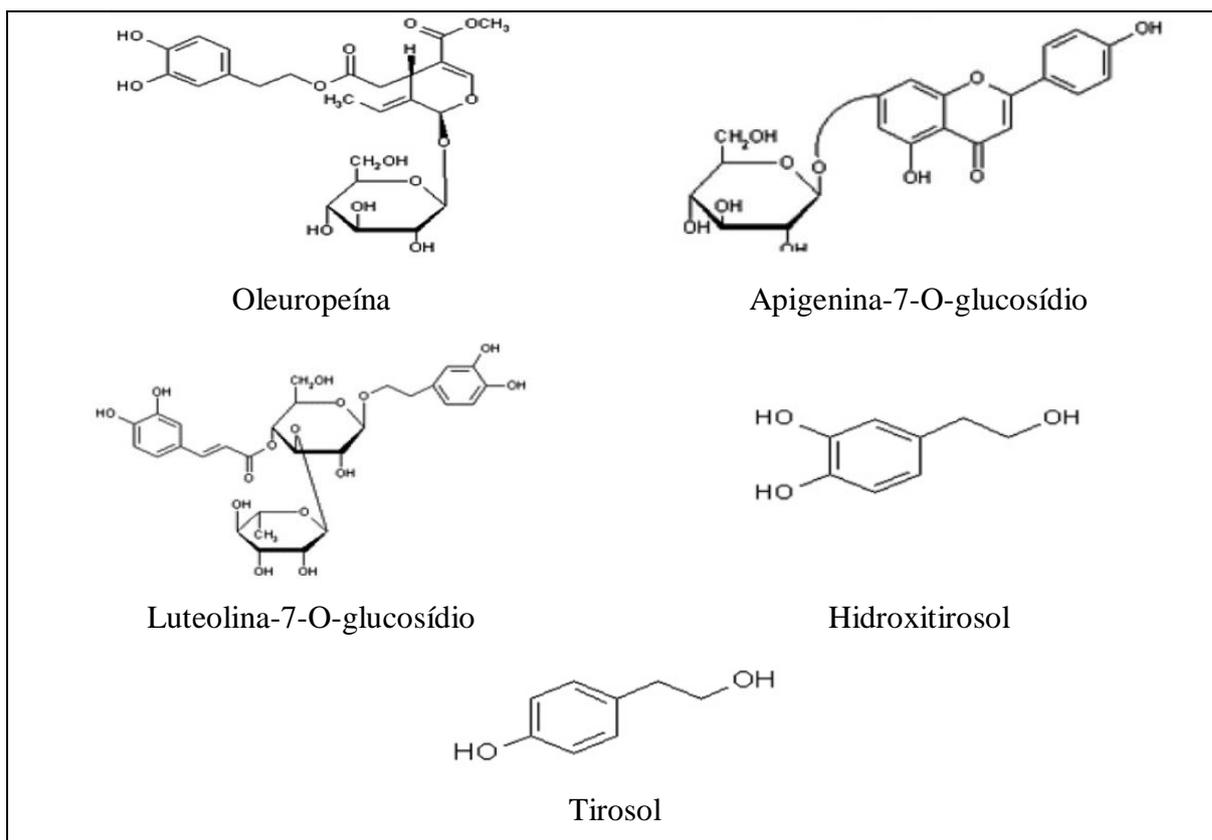
**Tabela 1:** Classes de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6 - C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6 - C_3$
Nafitoquinonas	$C_6 - C_4$
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Fonte: Harborne (1999) *apud* Angelo; Jorge, 2007.

A ação antioxidante dos compostos fenólicos é atribuída principalmente à suas propriedades de óxido-redução, que desempenham absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (ZHENG; WANG, 2001).

Na azeitona os principais compostos fenólicos presentes são antocianinas (glucosídeos de cianidina); flavonóis (principalmente quercetina-3-rutinosídeo); flavonas (luteolina e glucosídeos de apigenina); ácidos fenólicos (hidroxibenzoico, hidroxicinâmico, outros); álcoois fenólicos (tirosol, hidroxitirosol, 3,4-di-hidroxifenilglicol); secoiridóides (oleuropeína, dimetil oleuropeína, ligstrosídeo, nuzenido); verbascosídeo, um derivado de ácido hidroxicinâmico; e lignanas (BOSKOU, 2015; FRANCO et al., 2014; KANAKIS et al., 2013). Os principais compostos fenólicos presentes na folha de oliveira são mostrados na Figura 1, juntamente com suas fórmulas químicas, entre os quais destaca-se a oleuropeína (BENAVENTE-GARCIA et al., 2000).



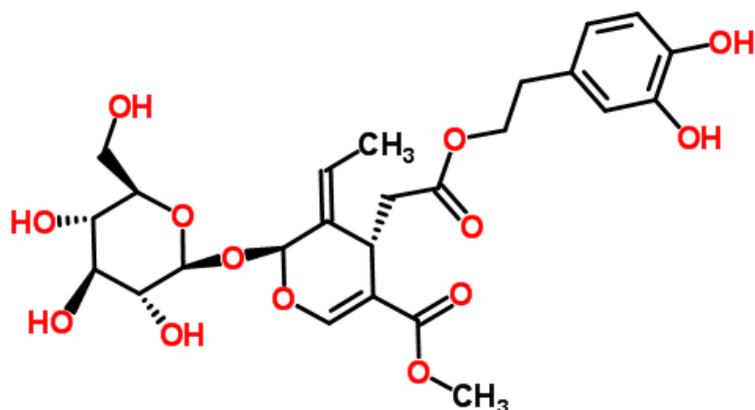
**Figura 1:** Componentes fenólicos presentes em maior quantidade no extrato de folhas de oliveira e suas respectivas fórmulas químicas de acordo com Hayes et al. (2011).

### 3.2.2 Oleuropeína

A oleuropeína (Figura 2) e o seu derivado, hidroxitirosol, são os compostos fenólicos predominantes nas folhas de oliveira (ERBAY & ICIER, 2010). A oleuropeína é classificada no grupo dos secoiridoides, que são compostos produzidos a partir do metabolismo secundário de terpenos. Estes compostos são encontrados apenas em plantas pertencentes à família de Oleaceae, incluindo *O. europaea* (BENDINI, et al., 2007).

Outras substâncias presentes em menores concentrações nas folhas são tirosol, ácido caféico, luteolina, verbascosídeo, dentre outras (Figura 1) (TASIOULA-MARGARI & OLOGERI, 2001).

A oleuropeína é um composto que representa 73% do total de constituintes secundários das folhas de *O. europaea* (PEREIRA et al, 2007), as folhas são a maior fonte do composto fenólico na planta, de 60 a 90 mg/g de folha seca (LE TUTOUR & GUEDON, 1992). A oleuropeína é um glicosídeo amargo que pode ser hidrolisado em hidroxitirosol, ácido elenólico glucosido, oleuropeína aglicona e glicose (MANNA et al., 2004).



**Figura 2:** Estrutura química de oleuropeína. Fonte: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444876.html?rid=9912c235-0410-4fd8-90a4-ee6bd725243f>.

A oleuropeína apresenta alto poder antioxidante e anti-inflamatório (AL-AZZAWIE; ALHAMDANI, 2006; VISIOLI et al. 2002), assim como ação antimicrobiana (CICERALE; LUCAS; KEAST, 2012), antiviral (LEE-HUANG et al., 2007), antitumoral (HAN et al., 2009; GOULAS et al., 2009), anticâncer (KIMURA; SUMIYOSHI, 2009), neuroprotetora (OMAR, 2010a), além de efeito benéfico para doenças cardiovasculares (BULOTTA et al., 2014) e outros efeitos benéficos para saúde humana bem documentados (OMAR, 2010a; BARBARO et al., 2014).

A oleuropeína é um composto muito sensível, dependendo das condições a qual é submetido, pode ser parcialmente ou totalmente degradado. Nas azeitonas em conserva, a oleuropeína é degradada em função do processo produtivo (altas temperaturas) e dos sais aplicados no fruto para que sejam conservados e envasados (PACETTA, 2013).

Em temperaturas superiores a 80°C a oleuropeína também é degradada, sendo considerada um composto termolábil (ANSARI, KAZEMIPOURB & FATHIB, 2011). Na extração do azeite de oliva a “frio”, a oleuropeína também pode ser degradada, devido as altas temperaturas que ocorrem na moagem e na centrifuga, nessa centrifugação a temperatura pode chegar aos 120°C (PACETTA, 2013).

Estudos mostraram que a adição de 5 gramas de folhas de oliveira secas e micronizadas por 10 dias a um frasco de azeite de oliva extra virgem aumenta o teor de oleuropeína no azeite

e esse acréscimo melhora em até 100 vezes as características nutracêuticas do azeite (PACETTA, 2013).

A oleuropeína tem sido extraída por diversas técnicas a partir de folhas de oliveira. A Tabela 2 mostra os principais trabalhos disponíveis na literatura aberta para a extração da oleuropeína empregando diversas técnicas, condições operacionais, tipos de solventes e rendimento percentual mássico, dando maior ênfase nas extrações que utilizam tecnologia verde.

**Tabela 2:** Condições operacionais de extração da oleuropeína a partir das folhas e resíduos da olivicultura.

Método	Condições operacionais			Solvente	Rendimento de extrato	Rendimento de oleuropeína	Referência
	T (°C)	P (Bar)	Vazão				
Extração por Soxhlet	25	1	-	Metanol	37mg/g folha seca	37.8 mg/g folha seca	(ŞAHIN; BILGIN; DRAMUR, 2011)
Extrato hidroalcoólico OHE <sup>1</sup>	25	1	-	Etanol: H <sub>2</sub> O (50:50)	-	29,1 %	(JIMENEZ et al., 2011)
SFE <sup>2</sup>	40	300	2,5 mL/min	CO <sub>2</sub> + 5% Etanol	-	6,7 %	(JIMENEZ et al., 2011) Jimenez et al. (2011)
SFE	50	300	9,6 kg/h	CO <sub>2</sub> + Etanol (20%)	17 %	5,1 %	(XYNOS et al., 2012)
SFE	100	300	2L/min	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O	233,68 (mg/g folha seca)	10,91 (mg/g folha seca)	(ŞAHIN; BILGIN, 2012)
Extração por líquido pressurizado (PLE)	115	103,4	-	Etanol	26,4 %	16,4 %	(XYNOS et al., 2012)
PLE	150	100	-	Etanol	22,4 %	-	(TAAMALLI et al., 2012)
PLE	150	100	-	H <sub>2</sub> O	11,2 %	-	(TAAMALLI et al., 2012)
PLE	120	103	-	Etanol: H <sub>2</sub> O (50:50)	5,8 %	-	(LOZANO-SÁNCHEZ; CASTRO-PUYANA; MENDIOLA, 2014)
PLE	115	103,4	-	Etanol (50%)	23,85 %	26,55 %	(XYNOS et al., 2014)
Extração por ultrassom assistida e pressão reduzida (URPE)	50	0,25	-	Etanol (75%)	-	7,05 %	(XIE et al., 2015)
Extração convencional + Extração antissolvente supercrítico (SAE)	35	150	-	CO <sub>2</sub>	-	36 %	(BALDINO et al., 2017)
Agitação magnética	25	-	-	Etanol:H <sub>2</sub> O (70:30) + 1% ácido acético	10,77 %	18,11 %	(COPPA et al., 2017)

Observa-se, a partir das informações da Tabela 2, que é possível obter oleuropeína empregando diversas técnicas com resultados promissores e que o uso PLE em fluxo contínuo com o etanol pressurizado ainda não é suficientemente explorado.

### 3.3 Azeite de oliva

O azeite é o principal produto obtido dos frutos das árvores de oliveira (*O. europaea*), obtido somente por meios mecânicos. Esse processo se diferencia de outros óleos vegetais por preservar os compostos minoritários originalmente presentes no fruto da oliveira. Em outros óleos vegetais geralmente esses compostos são removidos nas diversas etapas de refino (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005). A palavra azeite tem origem do árabe “az-zaitun”, que significa suco da azeitona (GOUVEIA, 1995).

Da azeitona (fruto da oliveira) é obtido o azeite, o fruto é classificado como drupa, o seu mesocarpo corresponde 70-90%, o endocarpo 9-27% e a semente 2-3% do peso total do fruto. No mesocarpo existe cerca de 30% de óleo, e a semente possui 27% de óleo. Do mesocarpo é extraído cerca de 95% do óleo total extraído do fruto (CONDE, DELROT & GERÓS, 2008).

Os principais componentes do azeite de oliva incluem triacilgliceróis, glicerídeos parciais e ácidos graxos livres, que representam mais do que 98% da massa total do óleo. Os componentes presentes em menores quantidades, cerca de 2% da massa do óleo, são hidrocarbonetos, triterpenos, pigmentos, tocoferóis e compostos fenólicos (BAKHOUCHE, 2015).

Na legislação brasileira o azeite é definido como produto oriundo do fruto da oliveira apenas por processos mecânicos ou outros meios físicos, nas condições térmicas que não alterem as características do azeite. O azeite também não pode ser submetido a outros tratamentos além de lavagem, decantação, centrifugação e filtração. O azeite de oliva é classificado como extravirgem quando a acidez máxima é de 0,8 g/100 g em ácido oleico e considerado virgem quando a acidez máxima é de 2,0 g/100 g e o índice de peróxidos máximo é de 20,0 mEq/kg (BRASIL, 2005).

As propriedades nutricionais e saudáveis do azeite são atribuídas à sua composição em ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico. Esse ácido aumenta o colesterol plasmático de lipoproteínas de alta densidade (HDL), considerado o colesterol bom, e diminui

o colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o colesterol ruim. Por este motivo, o ácido oleico pode prevenir doenças cardiovasculares, que são a principal causa de mortalidade nos países industrializados. Os ácidos graxos presentes no azeite de oliva classificados como poliinsaturados (ácidos linoléicos e linolênicos), com 18 átomos de carbono, são conhecidos como ácidos graxos essenciais, podendo ser sintetizados pelo corpo e devem fazer parte da dieta humana (KOIDIS & BOSKOU, 2006; GHANBARI et al., 2012).

Além dos ácidos graxos, os componentes presentes em baixas quantidades no azeite, como os hidrocarbonetos, triterpenos, pigmentos, tocoferóis e compostos fenólicos também possuem vários efeitos benéficos ao organismo humano, além de contribuir para as propriedades organolépticas de azeite de oliva. Também possuem atividades biológicas importantes que exercem efeito preventivo em relação ao desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas (BAKHOUICHE, 2015). Deste modo, fica evidente a importância de aumentar o teor de componentes fenólicos no azeite de oliva, a fim de aumentar o efeito benéfico que o produto proporciona ao ser consumido, gerar maior valor agregado ao produto, reduzir o descarte de matéria orgânica de interesse na natureza, estabelecer uma nova fonte de renda ao produtor e se consagrar como um agricultor amigo do meio ambiente.

### **3.4 Tecnologia verde**

Na atualidade, cada vez mais aumenta a demanda por tecnologias de extração que possibilitem a utilização de solventes atóxicos ao meio ambiente e que solventes sejam usados em menores quantidades. Nesse contexto, o conceito de tecnologia verde surge como alternativa a partir da necessidade de substituição das tecnologias convencionais (RODRÍGUEZ-ROJO et al., 2012; PURCARO, MORET & CONTE, 2014).

A extração Líquida Pressurizada (PLE - *Pressurized Liquid Extraction*) e a extração por fluido supercrítico (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*) são exemplos tecnologias verdes de extração de produtos de origem natural. Nessas técnicas, os solventes usados para extração são normalmente CO<sub>2</sub>, etanol e água, que são classificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Nelas é possível obter extrações mais eficientes devido a temperatura e pressão controladas, também pode haver seletividade de substâncias de interesse nos vegetais (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006). A seguir é descrita a extração líquida pressurizada utilizada nesse trabalho.

### 3.4.1 Extração líquida pressurizada

A PLE também é chamada de PSE (*Pressurized Solvent Extraction*) e ASE (*Accelerated Solvent Extraction*). A PLE é uma técnica de extração rápida e eficiente, geralmente usada para amostras sólidas e semi-sólidas, usando solventes líquidos sob altas pressões e temperaturas abaixo ou acima do ponto de bolha do solvente. A PLE é considerada uma técnica de extração melhor que técnicas realizadas em temperatura ambiente e pressão atmosférica (RICHTER et al., 1996; NIETO et al., 2010; PURCARO, MORET & CONTE, 2014). Durante o processo de extração, a PLE acelera a dessorção dos compostos da amostra e sua solubilização no solvente. Com uso de altas temperaturas, a cinética de extração é acelerada e a alta pressão mantém o solvente no estado líquido acima do ponto de ebulição, facilitando a solubilização do composto de interesse e permitindo extrações rápidas e eficientes (PURCARO, MORET & CONTE, 2014).

A PLE é considerada uma tecnologia verde por ser limpa e alternativa na extração de compostos bioativos das plantas, considerada atóxica quando o solvente utilizado é do tipo GRAS. Os parâmetros para extração utilizando essa técnica podem ser ajustados para uma maior seletividade e maior rendimento dos compostos de interesse, agregando valor aos produtos e resíduos, muitas vezes descartados na agricultura ou indústria (PAES et al., 2014). De acordo com Purcato, Moret & Conte (2014) outra vantagem desse método de extração é a obtenção de um extrato já filtrado, sendo desnecessárias outras etapas subsequentes para separar o resíduo sólido da amostra, além disso, a extração pode ser altamente seletiva.

Na PLE existem dois tipos de equipamentos para extração, estáticos e dinâmicos. No método dinâmico, o solvente é continuamente bombeado através do recipiente de amostra com temperatura e pressão constantes até um tempo previamente determinado. Esse sistema requer bombas de alta pressão. No método estático, é colocada a amostra em uma célula e o solvente, seguido por aquecimento que proporciona o aumento de pressão. Esse processo consiste em vários ciclos de extrações com substituição do solvente entre os ciclos (KAUFMANN et al., 2001; TURNER & WALDEBÄCK, 2010).

Para a escolha do solvente a ser utilizado na PLE leva-se em consideração os aspectos econômicos, segurança e sustentabilidade, por isso são mais utilizados os solventes menos tóxicos (GRAS), eles não são prejudiciais ao meio ambiente e são fáceis de remover ou

recuperar. Esses solventes são considerados "verdes". Esse conceito tem objetivo de diminuir o impacto ambiental gerado pelo uso do solvente no processo químico. Os álcoois simples (etanol) ou alcanos (heptano, hexano) são considerados solventes mais aceitáveis em comparação com dioxano, acetonitrilo, ácidos, formaldeído e tetrahidrofurano (CAPELLO, FISCHER & HUNGERBUHLER, 2007; MUSTAFA & TURNER, 2011).

A temperatura é geralmente o parâmetro que mais influência no processo de extração. Ela pode influenciar a velocidade, eficiência e seletividade. O aumento da temperatura favorece o processo de extração devido à redução de interações do composto com a matriz, aumento da solubilidade do composto de interesse no solvente de extração, diminuição da viscosidade e diminuição da tensão superficial do solvente e aumento da taxa de difusão do composto (MUSTAFA & TURNER, 2011; PURCARO, MORET & CONTE, 2014). A temperatura também pode melhorar a eficiência de extração por perturbar as interações dipolo e pontes de hidrogênio entre o analito e a matriz, diminuindo a energia de ativação necessária para a dessorção (RICHTER et al., 1996; MORENO et al., 2007).

A pressão é outro fator considerado importante na PLE, pois ela permite que o solvente permaneça na forma líquida, mesmo a temperaturas superiores ao ponto de ebulição. A pressão também promove a penetração do solvente dentro dos poros da matriz, facilitando a extração dos compostos de interesse e a diminuição das bolhas de ar que impedem o contato analito-solvente na matriz. (PURCARO, MORET & CONTE, 2014).

As curvas cinéticas de extração na PLE podem ser explicadas como no SFE, e elas são descritas em 3 etapas. Na etapa 1 (CER - *Constant Extraction Rate*) a taxa de extração é constante, nesta etapa o fenômeno transferência de massa é controlado pela convecção na interface entre o solvente e o sólido, na etapa 2 (FER - *Falling Extraction Rate*) a taxa de extração é decrescente, os fenômenos de convecção e difusão estão presentes nessa etapa e na etapa 3 (DCR - *Diffusion Controlled Rate*) a taxa de extração é controlada pela difusão (transferência de massa da molécula para o solvente) (MOURA et al., 2012).

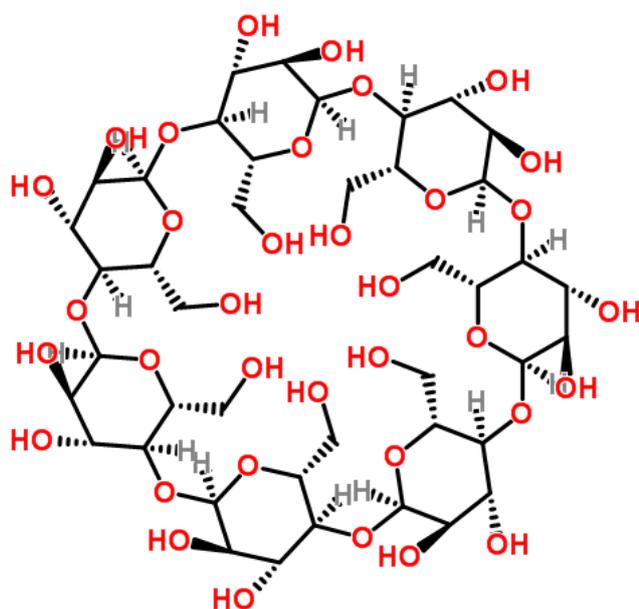
Conforme Khoddami et al. (2013) a PLE é uma técnica promissora para obtenção de compostos fenólicos de plantas. Diante disso, Lozano-Sánchez, Castro-Puyana & Mendiola (2014) realizaram extração de compostos fenólicos de resíduo da olivicultura e obtiveram rendimento de extrato de 5,8% utilizando temperatura de 120 °C e composição de etanol: água de 50:50 v/v. Nessas condições os autores também observaram maior teor de compostos fenólicos nos extratos. Outros autores como Xynos et al. (2014) realizaram PLE de modo

estático para extração de oleuropeína de folhas de oliveira e obtiveram rendimento de extrato de até 46,64% em temperatura de 190 °C, com 100% de etanol como solvente, para 3 ciclos de extração e 26,1% de oleuropeína em temperatura de 190 °C, 44:56 v/v (etanol:água) para 1 ciclo de extração. Outros autores também realizaram PLE de modo estático (vide Tabela 2).

### 3.5 Ciclodextrinas

As ciclodextrina (Figura 3) são oligossacarídeos cíclicos produzidos por microorganismos através da hidrólise enzimática do amido, processo catalisado pela enzima CGTase (LOFTSSON & MASSON, 2001; DEL VALLE, 2004; OLIVEIRA, SANTOS & COELHO, 2009). As ciclodextrinas naturais são alfa ( $\alpha$ -CD), beta ( $\beta$ -CD) e gama ( $\gamma$ -CD), compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranosose, respectivamente, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. Estes compostos possuem, em sua estrutura, grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. Assim, possuem exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica (MATIOLI, 2000).

As ciclodextrinas complexam moléculas que apresentem dimensões compatíveis e alteram suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade (MATIOLI, 2000). As  $\beta$ -CDs são as ciclodextrinas mais amplamente utilizadas na complexação com várias classes de fármacos (LOFTSSON & MASSON, 2001). Na Figura 3 é mostrada uma representação esquemática da  $\beta$ -CD.



**Figura 3:** Representação esquemática da estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina. Fonte: [http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10469496.html?rid=20cc73df-2865-4702-909b-55d831ea4518&page\\_num=0](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10469496.html?rid=20cc73df-2865-4702-909b-55d831ea4518&page_num=0)

### 3.5.1 Inclusão/microencapsulação com ciclodextrinas

Grande número de extratos vegetais ou os seus constituintes são empregados na indústria alimentar atualmente, também são usados atuar como principais ingredientes ativos em produtos cosméticos e produtos de saúde. Porém, a eficácia destes compostos ativos dependem da preservação da sua estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade (FANG & BHANDARI, 2010), diante dessa desvantagem surgem novas abordagens, como o uso de ciclodextrinas para encapsulamento dos extratos (PINHO et al., 2014).

As ciclodextrinas complexadas com outras substâncias ou quimicamente modificadas possuem potencial de aumentar a absorção dessas substâncias ligadas a elas, dessa forma podendo ser usadas como carreadoras em liberação controlada para substâncias em complexo, incluindo fármacos e antioxidantes. As moléculas hóspedes e hospedeiras podem apresentar maior aplicabilidade quando juntas. O uso combinado pode aperfeiçoar as propriedades da molécula hóspede e, em resposta, aumentar a sua eficácia, seja terapêutica ou antioxidante (HIRAYAMA et al, 2002).

A encapsulação do extrato de folhas de oliveira em  $\beta$ -ciclodextrina foi realizada pelos métodos de mistura física e empastagem por Mourtzinos et al. (2007). Os resultados mostraram que o encapsulamento com  $\beta$ -ciclodextrina evitou a oxidação dos fenóis, aumentando a resistência à temperatura, e também aumentou a solubilidade aquosa do resíduo fenólico da folha de azeitona em mais de 150 %.

Diversos extratos de plantas e seus derivados foram encapsulados em  $\beta$ -CD, demonstrando bons resultados para uso em alimentos, cosméticos e produtos para saúde humana (PINHO et al., 2014). Diante disso, tem-se a perspectiva de que a encapsulação do extrato de folha de oliveira pode ser usada como um aditivo alimentar com a vantagem de maior solubilidade e melhor disponibilidade dos flavonoides e antioxidantes presentes no extrato.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Matéria prima**

A matéria prima utilizada neste trabalho foi oriunda de cultivo comercial de oliveiras localizado em Águas da Prata, na serra da Mantiqueira, estado de São Paulo (22°00'48,6"S 46°37'59,4"W). As espécies de oliveira utilizadas foram da variedade Arbequina, Koroneiki e Arbosana. As folhas foram separadas dos ramos manualmente. As folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar (Lab Store, Nova Ética, model: 400/4ND, potência: 1580 W) a 35 °C, por aproximadamente 36 horas, até a massa constante e acondicionadas resultando em uma umidade relativa de 5% (AFANEH; YATEEM; AL-RIMAWI, 2015). Posteriormente, as folhas secas foram moídas e classificadas em peneiras de 9 *mesh* ( $\pm 2$  mm). Finalmente, as folhas trituradas foram acondicionadas em sacos plásticos no escuro em temperatura de aproximadamente 5 °C para o posterior uso nas extrações.

## 4.2. Caracterização da matéria prima

Para caracterização do material seco foram determinados teor de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, fibra bruta, carboidratos, atividade água ( $A_w$ ) e cor, todas as análises foram feitas em triplicata.

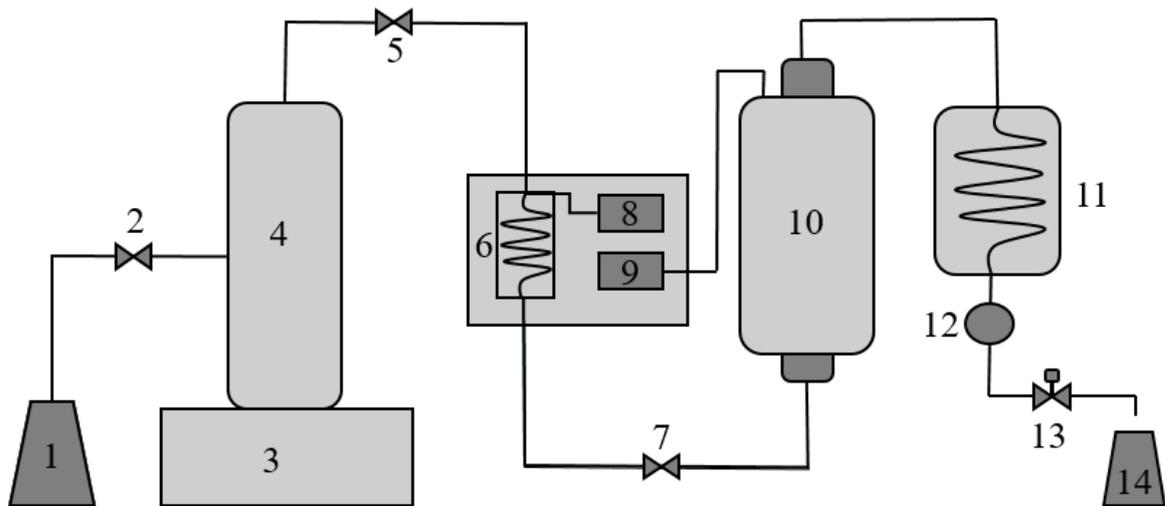
O teor médio de umidade presente no material *in natura* foi determinado pelo método 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008) por secagem direta em estufa a 105 °C. A determinação das cinzas foi realizada pelo método 018/IV do IAL (2008) de resíduo por incineração em mufla a 550 °C. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl modificado (IAL, 2008). A matéria prima seca utilizada é mostrada na Figura 4.

O teor de lipídios foi determinado por extração direta em Soxhlet utilizando solvente éter de acordo com método 032/IV do IAL (2008). A determinação da fibra bruta foi realizada pelo método 044/IV do IAL (2008). A atividade água ( $A_w$ ) foi determinada por medidor de atividade de água (Aqua Lab Dew Point Water Activity Meter 4TE). Para determinação da cor foi utilizado colorímetro. O sistema de cores usado foi CIELAB, em que  $L^*$  é luminosidade, varia do 0 (preto) até 100 (branco). O eixo  $a^*$  representa a variação de cor do vermelho ( $+a^*$ ) ao verde ( $-a^*$ ), o eixo  $b^*$  representa a variação de cor do amarelo ( $+b^*$ ) ao azul ( $-b^*$ ) (BERGUER-SCHUNN, 1994).



**Figura 4:** Folhas de oliveira após a secagem em estufa de circulação de ar.

O solvente utilizado para extrações foi o etanol 99,5 °GL (Nuclear) sem tratamento prévio. O esquema do equipamento utilizado para extração líquida pressurizada das folhas de *O. europaea* é mostrado na Figura 5, e a Figura 6 mostra uma foto do mesmo equipamento utilizado para as extrações.



**Figura 5:** Esquema do equipamento utilizado para a extração subcrítica de folhas de oliveira. (1) recipiente de alimentação de solvente, (2) válvula agulha, (3) controlador da bomba seringa, (4) bomba tipo seringa, (5) válvula agulha, (6) pré-aquecedor, (7) válvula agulha, (8) controlador de temperatura do pré-aquecedor, (9) controlador de temperatura do recipiente extrator, (10) recipiente extrator, (11) sistema de resfriamento, (12) indicador de pressão, (13) válvula “back pressure”, (14) recipiente de coleta.



**Figura 6:** Foto do equipamento utilizado nas extrações.

### 4.3 Extração líquida pressurizada de oleuropeína de folhas de oliveira

As extrações foram conduzidas utilizando um planejamento fatorial do tipo  $2^3$  com triplicatas no ponto central. A Tabela 3 mostra os fatores e os níveis do planejamento para a extração de oleuropeína utilizando etanol pressurizado.

**Tabela 3:** Fatores e níveis que compõe o planejamento fatorial  $2^3$  completo com pontos centrais a serem utilizados na extração de oleuropeína das folhas de oliveira utilizando etanol 99,5°.

Fatores	Unidades	Níveis		
		(-1)	(0)	(1)
Temperatura	°C	30	45	60
Pressão	bar	100	150	200
Fluxo	mL min <sup>-1</sup>	0,5	0,75	1,0

Inicialmente, 4 g de folhas secas e moídas foram adicionadas no recipiente extrator. Em seguida, o sistema de extração foi preenchido com etanol nas condições de operação

(temperatura, pressão e vazão) mostrado pela Tabela 2. A cinética de extração foi de 5 horas para cada condição. Os extratos etanólicos obtidos foram evaporados em estufa com circulação de ar a 55 °C até que a massa do frasco fosse invariante. Os rendimentos percentuais mássicos dos extratos secos foram determinados usando uma balança analítica (Denver Instrument, model: APX-200). As curvas cinéticas de extração foram determinadas nos seguintes intervalos de tempos: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 minutos.

#### **4.4 Análise do teor de oleuropeína nos extratos**

As análises foram realizadas em equipamento HPLC nas seguintes condições: fase móvel: metanol : água (50:50), o fluxo: 1 ml min<sup>-1</sup>, o comprimento de onda: 280 nm, a temperatura do forno: 30 °C e o volume injetado: 5 µL e coluna C18. Para determinação da curva-padrão foi utilizada oleuropeína pura (95% pureza, oleuropeína oriunda da Universidade do Porto, Portugal) em metanol. Uma solução de concentração de 0,125 µg/µL foi preparada. Em seguida foram injetadas alíquotas de 1 µL, 2 µL, 4 µL e 6 µL. A partir da relação entre a massa (concentração inicial de 0,125 µg/µL pelo volume de injeção) com a área foi obtida a curva padrão de oleuropeína. As amostras dos extratos secos foram diluídas em metanol (concentração 1,0 µg/µL) e alíquotas de 5 µL foram injetadas no HPLC.

#### **4.5 Determinação dos componentes fenólicos totais**

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado para determinação do teor de fenólicos totais presentes nas amostras de extrato (BOROSKI et al., 2015; FOLIN & CIOCALTEAU, 1927). Uma solução de 2500 µg ml<sup>-1</sup> de extrato diluído em etanol foi preparada e 0,5 ml dessa solução foi transferida para um tubo de ensaio com 2,5 ml de reativo de Follin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) 10%. Após a homogeneização e repouso por 8 min foi adicionado 2,0 ml de solução de carbonato de sódio (Anidrol) 7,5%. Em seguida, procedeu-se nova homogeneização e repouso por 30 min. A absorbância da mistura reacional (760 nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Hach/DR 2800). A água destilada foi utilizada com referência. O ácido

gálico (Sigma Aldrich) foi utilizado como padrão comparativo. A quantidade de compostos fenólicos foi expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

#### 4.6 Análise de antioxidantes DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada utilizando o método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de acordo com a metodologia proposta por BOROSKI et al., 2015; GYAMFI, YONAMINE & ANIYA, 1999. As amostras de extrato foram diluídas em etanol a uma concentração inicial de 2000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Os volumes de 250, 500, 750, 1000 e 1500  $\mu\text{l}$  da solução foram transferidos para tubos de ensaios com 2,0 ml de solução de DPPH (Sigma Aldrich) 47  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Após 30 min de incubação no escuro foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hach/DR 2800) a 517 nm. O metanol (Panreac) foi usado como referência. A atividade antioxidante em relação ao DPPH foi calculada através da equação 1, em triplicata

$$AA_{DPPH}(\%) = \left( \frac{A_{DPPH} - (A - A_B)}{A_{DPPH}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que  $A_{DPPH}$  é a absorbância da solução de DPPH; A e  $A_B$  são as absorbâncias das amostras e do branco, respectivamente.

A concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH ( $IC_{50}$ ) foi calculada a partir da equação de reta via gráfico da porcentagem de atividade antioxidante versus concentração em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.7 Encapsulação do extrato de folha de oliveira em $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD)

A encapsulação/inclusão do extrato obtido foi feita a partir de extratos obtidos por 150 minutos nas condições de temperatura: 70 °C, pressão: 100 bar e 0,5  $\text{ml min}^{-1}$  de vazão de etanol (rendimento de 9,70% de oleuropeína). A inclusão do extrato (molécula hóspede) na  $\beta$ -CD (molécula hospedeira) foi feita a partir dos seguintes métodos: mistura física, mistura física +  $\text{CO}_2$  supercrítico, kneading e kneading +  $\text{CO}_2$  supercrítico. A razão molar utilizada para a inclusão foi de 1:4 g/g (hóspede : hospedeiro). Os métodos de encapsulação/inclusão utilizados estão descritos a seguir:

#### **4.7.1 Mistura física (MF)**

Nessa técnica foi realizada a mistura de 5 g de extrato e 20 g de  $\beta$ -CD, em temperatura ambiente, com auxílio de almofariz de porcelana e pistilo durante 15 minutos, sem a adição de solvente (Figura 7). A mistura final foi colocada em frascos de vidro cor âmbar e armazenadas para a utilização.



**Figura 7:** Mistura física de  $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de oliveira.

#### **4.7.2 Kneading (amassamento) (KN)**

Nesse processo, primeiramente foi feita a mistura física da  $\beta$ -CD com o extrato de oliveira, em seguida foi feita a adição de 1 ml de água e amassamento durante 15 minutos (Figura 8). A pasta formada foi seca estufa de circulação de ar a 45-50 °C durante 24 horas. Os complexos secos foram então pulverizados e armazenados em frascos de vidro cor âmbar e armazenados para a utilização (SONIWALA,2005; GHOSH, BISWAS & GHOSH, 2011).



**Figura 8:** Kneading ou amassamento de  $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de oliveira antes da secagem.

#### ***4.7.3 CO<sub>2</sub> Supercrítico***

O método de inclusão por CO<sub>2</sub> supercrítico foi aplicado para as amostras mistura física (MF) e o kneading (KN). Para este método foi utilizada a câmara de mistura do equipamento antissolvente supercrítico (SAS) com o instrumento Super Particle SAS Modelo 200 (THAR) (Figura 9). Para o procedimento foram pesadas 3 g das amostras KN e MF, então colocadas na célula (uma de cada vez), o equipamento foi devidamente fechado e iniciou-se o processo, o solvente utilizado foi CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> foi bombeado para dentro da célula até a pressão desejada de 300 bar. A temperatura foi controlada em 60 °C com uso de termopar. A pressão e temperatura foram embasados em dados encontrados na literatura (LUCAS et al., 2002). O processo ocorreu de modo estático durante duas horas. Na Figura 10 é mostrada a amostra KN após o processo.



**Figura 9:** Equipamento antissolvente supercrítico (SAS) utilizado na microencapsulação/inclusão dos extratos na  $\beta$ -Ciclodextrina.



**Figura 10:** Microencapsulados (KN) de  $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de oliveira após o processo supercrítico.

#### 4.8 Caracterização dos microencapsulados/complexos de Inclusão

Quando é feita a inclusão de moléculas, as suas características físico-químicas não são mais as mesmas de quando eram isoladas. Para observar as mudanças ocorridas após a inclusão

é necessário utilizar técnicas que tenham sensibilidade para medir essas mudanças e dessa forma caracterizar as moléculas complexadas e livres (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007). Nesse trabalho foram utilizadas as seguintes metodologias para caracterização dos complexos e compostos isolados: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e Difração de Raios X (DRX).

#### ***4.8.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)***

Para essa análise aproximadamente 10,0 mg foram diluídos em 600,0 µL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*6). Após a completa solubilização foram transferidos 500,0 µL da solução para o tubo de análise de RMN. Os experimentos em RMN foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III 500 que opera a 11,75 T, observando <sup>1</sup>H a 500,13 MHz. O espectrômetro foi equipado com uma sonda de três canais (<sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H and XBB) de detecção inversa de 5 mm.

Para a caracterização dos sinais do extrato de oliveira e da β-ciclodextrina foram realizados experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e de correlações homonucleares COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) e heteronucleares HSQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C). Na etapa de determinação da possível interação extrato/β-ciclodextrina foram realizados experimentos de excitação seletiva com transferência seletiva (NOEDIF-1D), TOCSY (RMN-2D, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H<sub>dipolar</sub>).

#### ***4.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

Nesse trabalho a microscopia de varredura foi usada para realizar uma caracterização morfológica superficial das amostras e dos possíveis complexos formados através dos diferentes métodos de inclusão. Foi utilizado em microscópio eletrônico de varredura Quanta 250 (Thermo Fisher Scientific-FEI, Oregon, EUA) para amostras secas. Foi utilizado um metallizador para a preparação de amostras, Sputter Coater, modelo SCD 050 (Bal-Tec, Califórnia, EUA). Pequenas porções de amostras secas foram cuidadosamente depositados na superfície do talão contendo fita adesiva de carbono de dupla face. Em seguida, as amostras

foram metalizadas por deposição de uma fina camada de ouro e avaliadas por microscopia eletrônica de varredura.

#### ***4.10.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)***

Para o experimento foram usadas pastilhas de KBr (Brometo de potássio) para preparação das amostras. A faixa espectral utilizada no equipamento foi de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , modelo Vertex70 v, Bruker, Ettlingen, Alemanha.

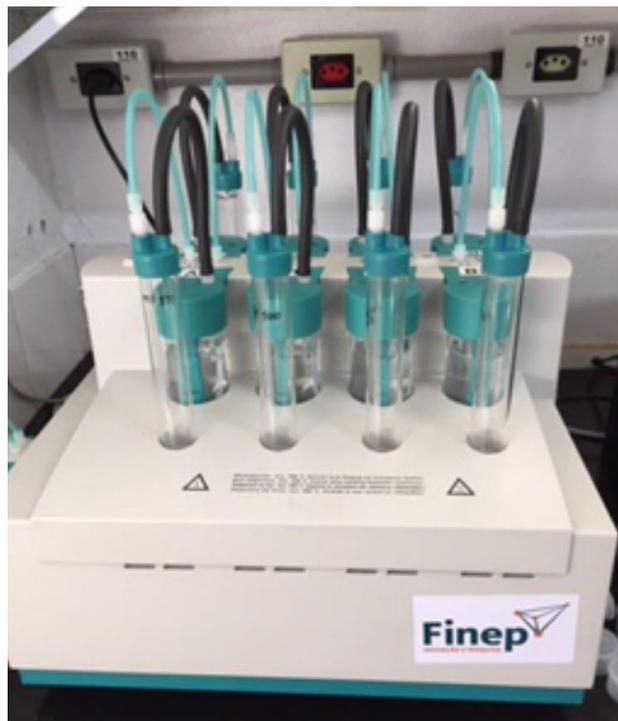
#### ***4.8.4 Difração de Raios X***

Para a análise foi utilizado um difratômetro modelo D8, Bruker BioSpin que foi operado a 40 kV e 35 mA na faixa de ângulo de saída de 5 a 40° e velocidade de varredura de 0,02 a 0,58° por minuto.

### **4.9 Aplicação dos Extratos e Microencapsulado em Azeite de Oliva e Avaliação da estabilidade oxidativa em Rancimat**

O extrato de folha de oliveira microencapsulado e puro foi aplicado diretamente ao azeite de oliva comum da marca Carbonell adquirido em supermercado em Maringá - PR. O extrato microencapsulado foi adicionado ao azeite nas seguintes proporções: 0, 200, 500 e 1000 mg microencapsulado/kg de azeite. As garrafas foram colocadas em agitação em shaker durante 24 horas e então armazenadas em local escuro até data da análise. Nessa etapa foi avaliada a estabilidade oxidativa em Rancimat (Laboratório de biocombustíveis, UEL-Londrina) nas condições de 120 °C e fluxo de ar de 10 L/h. Não foram realizadas triplicatas dessas análises devido ao alto custo, ao tempo de uso do aparelho devido à grande quantidade de amostras e pela boa calibração e precisão que o equipamento fornece.

No Rancimat (Figura 11) o fluxo de ar passa através do óleo, sendo aquecido (100 a 140 °C), o ar borbulha em água desionizada, dessa forma, arrastando os ácidos carboxílicos voláteis gerados no processo de oxidação, os gases se solubilizam e aumentam a condutividade elétrica da água (JORGE, 2010).



**Figura 11:** Equipamento Rancimat utilizado nos experimentos de estabilidade oxidativa de azeite de oliva.

#### **4.10 Análise estatística**

As análises de variância (ANOVA) dos resultados ou dados obtidos foram estudados utilizando software Statistica® 8.0 e Origin 8. O nível de significância estatística considerado foi de 0,05.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Caracterização da matéria prima**

A Tabela 4 mostra os teores de umidade, de cinzas, de lipídeos, de proteínas, de fibra bruta, e de carboidratos determinados pelos métodos descritos e alguns valores encontrado na literatura a título de comparação.

As folhas de oliveira utilizadas nos experimentos das variedades Arbequina, Koroneiki e Arbosana apresentaram 5,85% de umidade (Tabela 4). A umidade baixa observada é um parâmetro importante para a padronização da matéria prima para extração.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos e um comparativo com a literatura. Coppa et al (2017) usando pó seco de folhas de oliveira mostram teores de umidade semelhantes com os obtidos no trabalho, já o teor de cinzas foi superior (11,89%) e lipídios foi inferior (3,70%).

**Tabela 4:** Caracterização das folhas de oliveira utilizadas nos experimentos, porcentagem em massa seca.

<b>Análise</b>	<b>Conteúdo (%)</b>	<b>Literatura (%)</b>
Umidade	5,85 ± 0,049	4,82 <sup>1</sup>
Cinzas	5,58 ± 0,153	11,89 <sup>1</sup> ; 4,38 <sup>2</sup>
Lipídios	9,04 ± 0,718	3,70 <sup>1</sup> ; 8,14 <sup>2</sup>
Proteína	13,01 ± 0,472	10,85 <sup>1</sup> ; 12,24 <sup>2</sup>
Fibra Bruta	3,40 ± 0,33	14,55 <sup>1</sup>
Carboidratos	63,11	59,00 <sup>1</sup> ; 19,56 <sup>2</sup>

Média ± desvio padrão. <sup>1</sup>Coppa et al. (2017); <sup>2</sup> Cavalheiro et al. (2014)

A caracterização físico-química das folhas de oliveira (Tabela 4) demonstra a similaridade entre matéria-prima usada neste trabalho e a utilizada em trabalhos disponíveis na literatura.

As folhas de cultivares de oliveiras como a Arbequina, cultivadas no Sul do Brasil, apresentam uma composição química interessante comparado com variedades cultivadas em outros países por apresentar altos teores de proteínas (CAVALHEIRO et al., 2014). O alto teor de proteínas é interessante para aplicabilidade em dietas humanas e de animais (AHMAD-QASEM et al., 2013).

A composição centesimal de cinzas (4,4%), proteínas (12,2%) e lipídeos (8,1%) obtida por Cavalheiro et al., 2014 em folhas de oliveira cultivadas no Brasil, na região de Caçapava do Sul-RS, foi semelhante aos resultados obtidos nesse trabalho (Tabela 3). Em oliveiras cultivadas na Tunísia, algumas cultivares apresentaram porcentagem menor de proteínas e

lipídios, a cultivar Chetoui apresentou 5,04% de proteínas e 1,23% de lipídios (BOUDHRIOUA et al., 2009).

O valor da atividade água ( $A_w$ ) encontrado na amostra de extrato foi baixo ( $0,48 \pm 0,023$ ). O pré-tratamento das folhas de oliveira para alcançar valores de atividade de água inferior a 0,60 é desejado para impedir o desenvolvimento de microrganismos decompositores.

Os dados obtidos são importantes para uma possível aplicação das folhas de oliveira para suplementação na alimentação de animais ou humanos. Por exemplo, existem dados de usos de folhas de *O. europaea* para suplementação dietética de galinhas para reduzir o teor de colesterol da gema do ovo e aumentar a coloração da gema (BOTSOGLOU et al., 2013; CAYAN & ERENER, 2015).

Na Tabela 5 estão os dados de coloração da amostra usada nos experimentos.

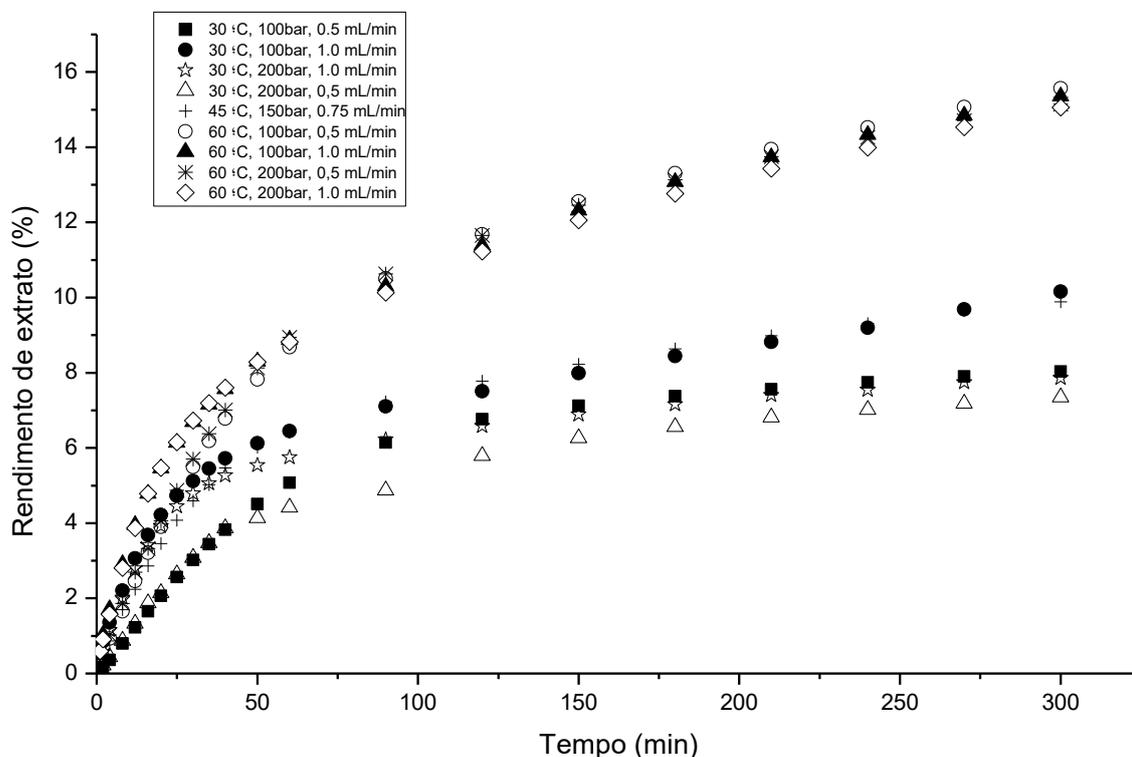
**Tabela 5:** Dados de cor de folhas de oliveira utilizadas nos experimentos

Cor	Média
L*	$46,80 \pm 0,879$
a*	$4,57 \pm 0,150$
b*	$21,47 \pm 0,625$

O valor de L\* para as amostras foi de 46,80, demonstrando tons relativamente escuros. O valor de a\* foi 4,57, demonstrando ser mais voltado para o verde, devido a presença de clorofila nas folhas. O valor de b\* foi 21,47, mais voltado para o amarelo, provavelmente devido à presença de carotenos nas folhas (KIDMOSE et al., 2002), ou também devido ao processo de secagem. Boudhrioua et al. (2009) observaram valores do parâmetro a\* negativo, indicando a cor mais verde de folhas de oliveira, porém, as folhas eram frescas (HEALTON & MARANGONI, 1996). Boudhrioua et al. (2009) encontraram valores de L\* entre 29,79 e 35,02 e b\* variou entre 6,24 e 11,37, como as folhas eram frescas os valores de L\* e b\* foram mais baixos porque com a secagem as folhas perdem um pouco a coloração verde e ficam mais amareladas. No entanto, os autores relataram diferença significativa de coloração entre as variedades testadas, variedades cultivadas na Tunísia.

## 5.2 Rendimento de extrato e oleuropeína

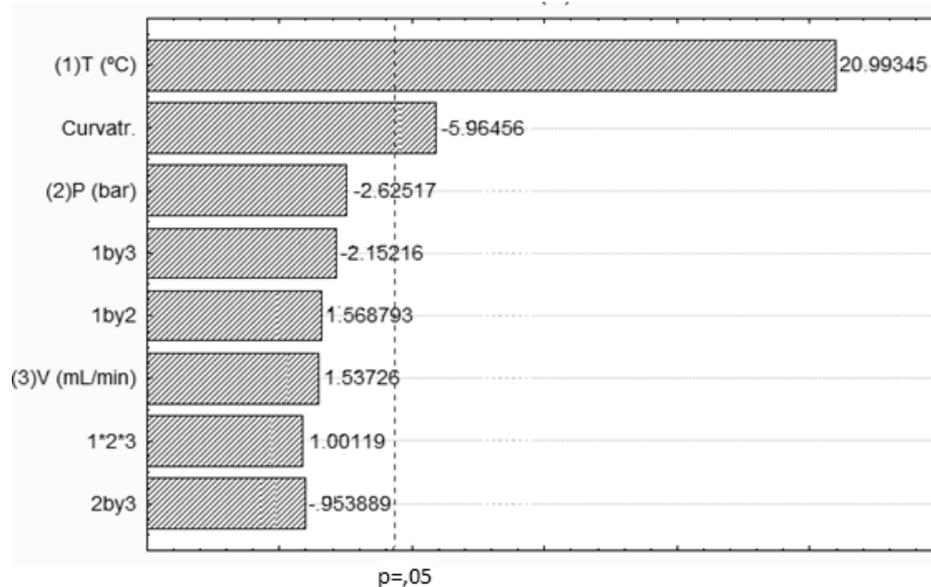
As curvas cinéticas de extração das folhas de oliveira foram feitas a partir de extrações de 300 minutos, que foi o tempo em que foi observada a fase difusional. Na Figura 12 observa-se que em torno de 70 minutos ocorre a maior parte de extração, ou seja, a obtenção de maior massa de extrato. Após esse período a difusão é predominante. Esse comportamento na PLE pode ser explicado como no SFE, de acordo com as 3 etapas de extração (Tópico 3.4.1). No processo de extração é ideal que as curvas alcancem a fase difusional, como observado na Figura 12. A Tabela com os dados utilizados para obtenção das curvas cinéticas encontra-se nos apêndices.



**Figura 12:** Cinética de extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira em diferentes condições de extração (temperatura, pressão e vazão de solvente).

Quando foi empregada a temperatura de 60 °C, as curvas de extração foram superiores, apresentando maiores rendimentos mássicos de extrato. Como mostra a análise estatística (Figura 13), onde a temperatura aparece como parâmetro com efeito positivo na extração, proporcionando maior rendimento do extrato (14,53 a 15,06%), independentemente da pressão

e vazão do solvente. Isso demonstra que é possível usar a menor vazão de solvente e menor pressão para economia de solvente e energia.



**Figura 13:** Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre o rendimento do extrato das folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado.

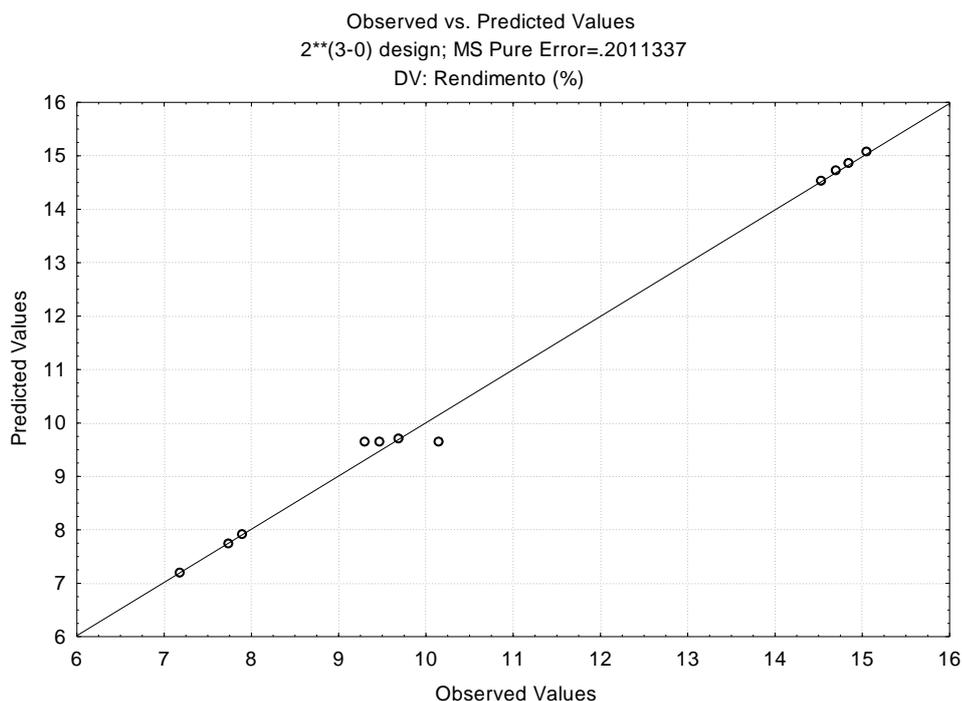
Os rendimentos obtidos nas extrações de acordo com delineamento experimental variaram de 7,19 até 15,05% (Tabela 6), confirmando a temperatura como fator determinante no rendimento. A interação dos fatores não foi significativa. Isso pode ser explicado porque a temperatura é um parâmetro de grande influência em um processo de PLE, podendo melhorar a eficiência de extração por perturbar as interações dipolo e pontes de hidrogênio entre o analito e a matriz, diminuindo a energia de ativação necessária para a dessorção, também diminuindo a tensão superficial e a viscosidade do solvente (MORENO, REZA & TREJO, 2007; RICHTER et al., 1996).

A pressão na PLE permite que o solvente permaneça na forma líquida, mesmo a temperaturas superiores ao ponto de ebulição e também facilita a penetração do solvente nos poros da amostra (PURCARO, MORET & CONTE, 2014). No entanto no presente estudo ela não foi um parâmetro significativo (Figura 13), bem como a vazão de solvente. A vazão mesmo não sendo significativa nessa extração, é um fator a ser considerado na PLE de fluxo contínuo, podendo ter efeito no rendimento de extração, já que o solvente entra no sistema continuamente (PURCARO; MORET; CONTE, 2014).

**Tabela 6:** Rendimento dos extratos obtidos na extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira de acordo com delineamento experimental.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão de solvente (mL/min)	Rendimento extrato (%)
30	100	0,50	7,90
30	200	0,50	9,69
30	100	1,00	7,19
30	200	1,00	7,74
45	150	0,75	9,65
60	100	0,50	15,06
60	200	0,50	14,85
60	100	1,00	14,71
60	200	1,00	14,53

O modelo de regressão linear para as variáveis (Equação 2) obtido via análise estatística, apresenta um  $R^2$  de 0,9959, ou seja 99,59% da variável rendimento de extrato de folhas de oliveira ( $R_{Ext}$ ) consegue ser explicada pelos regressores do modelo. O gráfico dos valores preditos *versus* observados mostra que foi obtido um bom ajuste dos dados ao modelo (Figura 14), o valor de  $R^2$  também indica que o modelo consegue explicar bem os valores observados. A curvatura significativa indica que possivelmente os valores quadráticos podem considerados, no entanto, o modelo linear se ajustou bem aos dados, como mostrado pelo coeficiente de regressão linear.



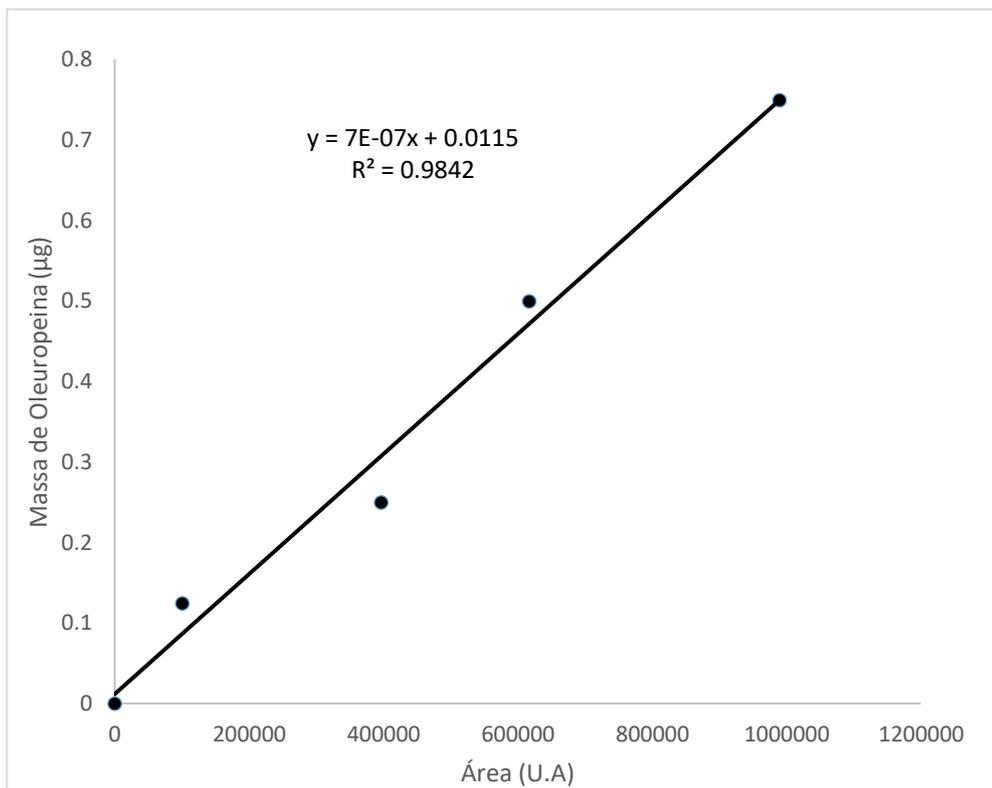
**Figura 14:** Valores preditos *versus* observados do rendimento da extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira.

$$R_{Ext} = 11,46 + 3,33T - 0,42P + 0,24V + 0,25TP - 0,34TV - 0,151PV + 0,16TPV \quad \text{Equação 2}$$

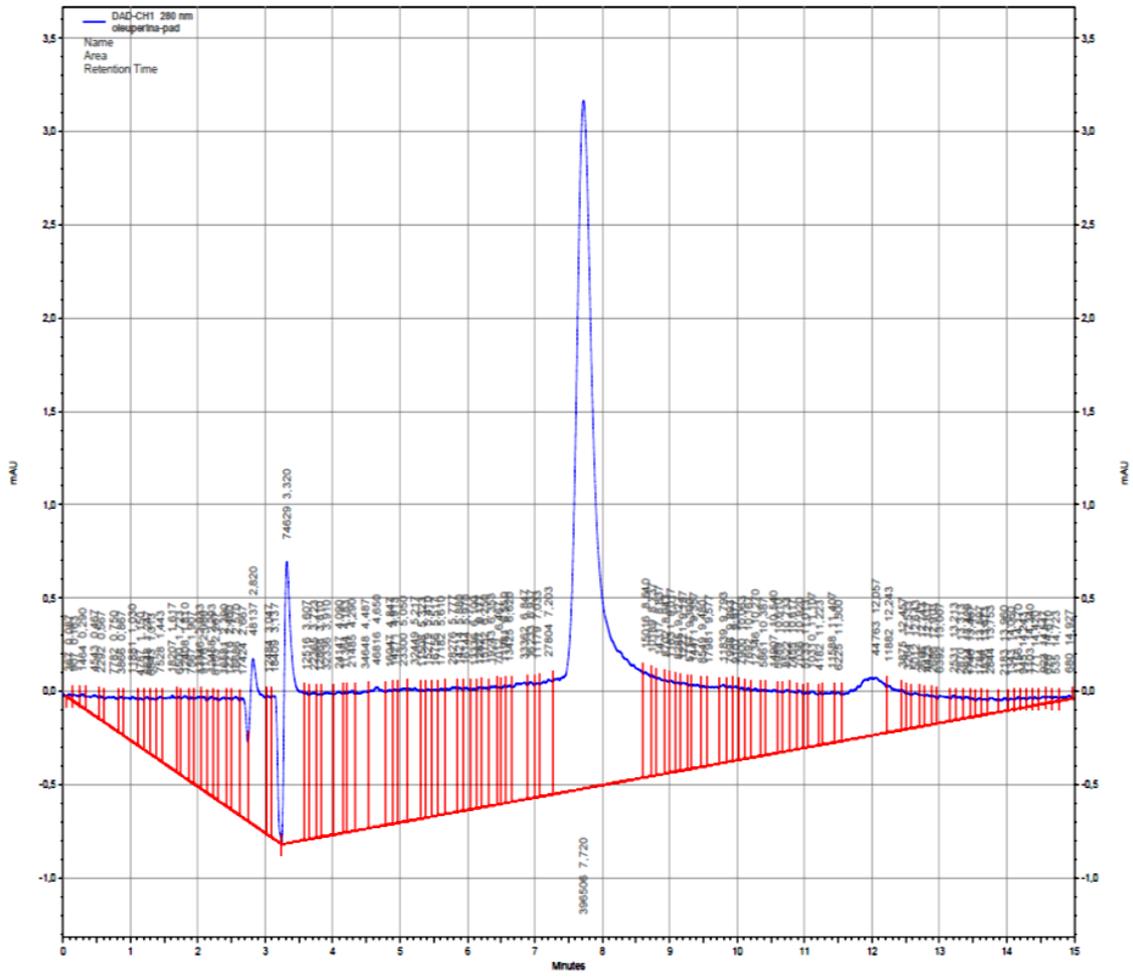
$$R^2 = 0,9959$$

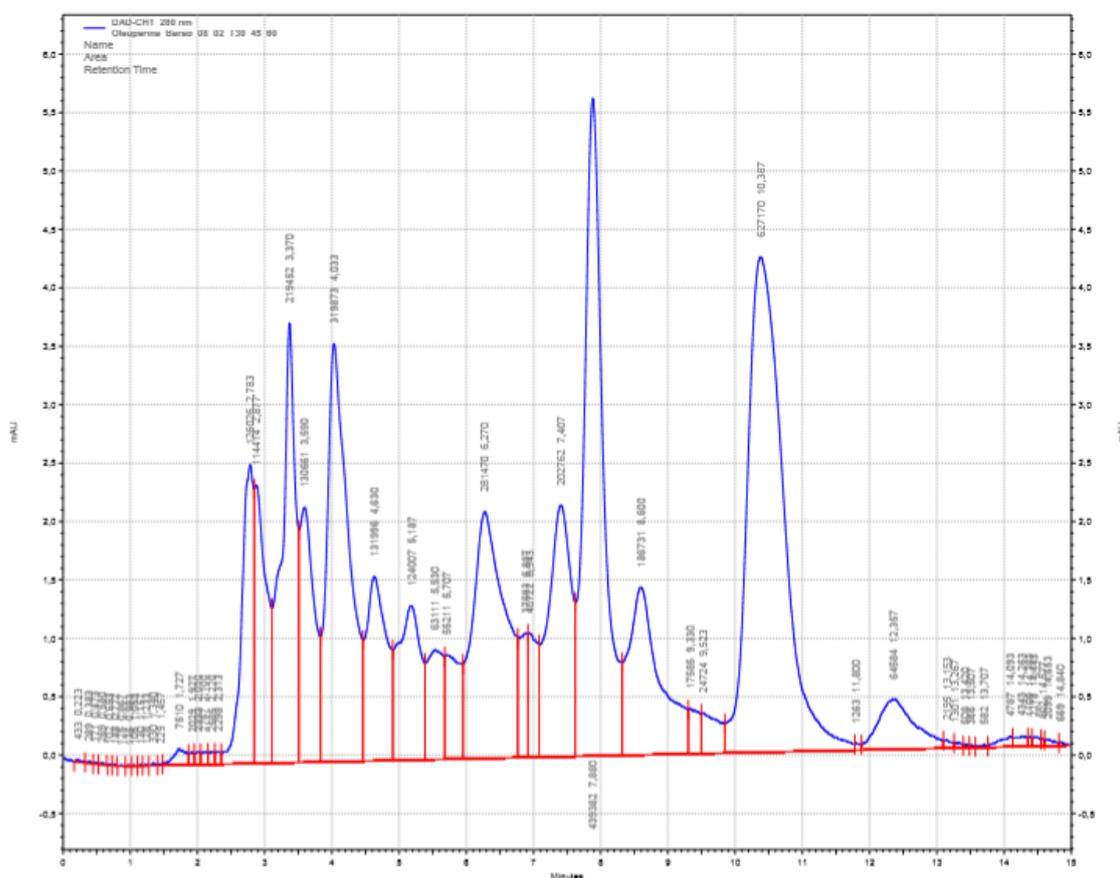
em que  $R_{Ext}$  é o rendimento do extrato (%),  $T$  é a temperatura (°C),  $P$  é a pressão (bar) e  $V$  é a vazão do solvente ( $\text{mL min}^{-1}$ ).

Para determinação do teor de oleuropeína nos extratos secos, foi determinada a curva padrão da oleuropeína (Figura 15) obtida a partir da relação entre a massa (concentração inicial de  $0,125 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  pelo volume de injeção) e a área do pico. A Figura 16 mostra o cromatograma característico do padrão de oleuropeína utilizado para as amostras. O tempo de retenção foi de 7,7 minutos. Na Figura 17 é mostrado o cromatograma de uma amostra extraída a  $60^\circ\text{C}$ . Observa-se nos picos característicos dos componentes do extrato de folhas de oliveira, o tempo de retenção foi deslocado em alguns segundos. Há um pico pronunciado após os 10 minutos, que provavelmente deve-se a presença de clorofila.



**Figura 15:** Curva padrão de oleuropeína.





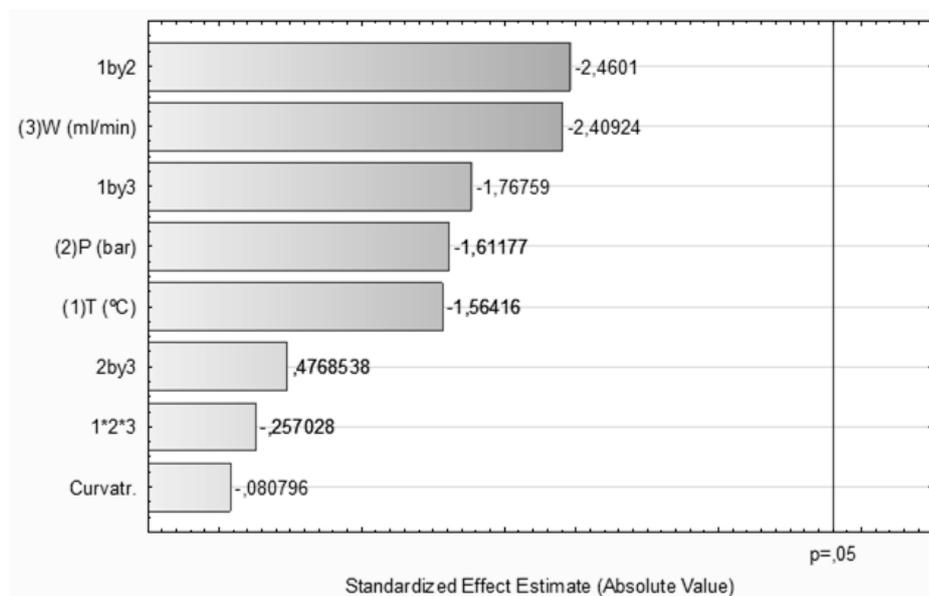
**Figura 17:** Cromatograma da amostra seca extraída nas condições de temperatura de 60°C, pressão de 100 bar e vazão de etanol de 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

O rendimento de oleuropeína nos extratos foi semelhante em todas as condições de extração do experimento, os valores variam de 8,05 a 8,92% (Tabela 7). Os fatores temperatura, pressão e vazão de etanol não exerceram influência no teor de oleuropeína e também não houve a interação dos fatores de acordo com a análise estatística, como observado no diagrama de Pareto (Figura 18). Levando em consideração o rendimento do extrato, pode-se inferir que usando uma temperatura mais alta é possível obter extratos com maior teor de oleuropeína, porque o rendimento mássico de extrato foi maior, já que a pressão e a vazão do solvente não interferiram nos resultados.

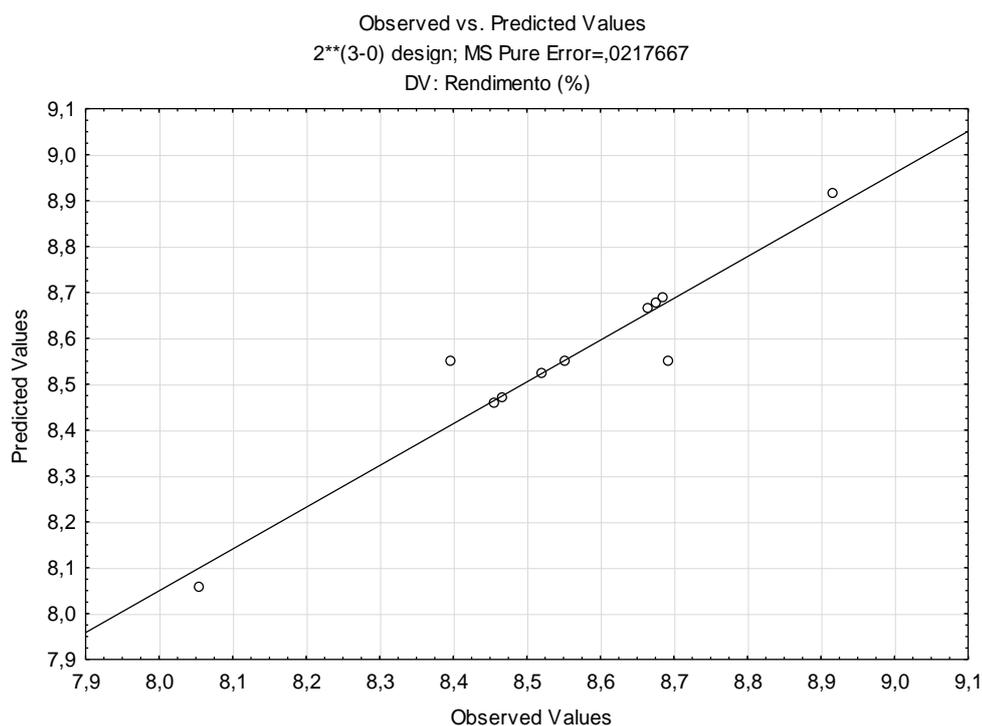
**Tabela 7:** Rendimento de oleuropeína nos extratos obtidos na extração com etanol pressurizado das folhas de oliveira de acordo com delineamento experimental.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão de solvente (mL/min)	Rendimento Oleuropeína (%)
30	100	0,50	8,66
30	200	0,50	8,68
30	100	1,00	8,52
30	200	1,00	8,69
45	150	0,75	8,55
60	100	0,50	8,92
60	200	0,50	8,47
60	100	1,00	8,46
60	200	1,00	8,05

O modelo de regressão linear para as variáveis é mostrado na Equação 3. O gráfico dos valores preditos *versus* observados mostra o ajuste dos dados ao modelo (Figura 19), o valor de R<sup>2</sup> também indica que o modelo consegue explicar bem os valores observados (0,9104).



**Figura 18:** Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre o rendimento de oleuropeína nos extratos obtidos por etanol pressurizado.



**Figura 19:** Valores preditos *versus* observados do rendimento de oleuropeína (%) nos extratos de folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado.

$$R_{ole} = 8,56 - 0,081T - 0,084P + 0,013V + 0,128TP - 0,092TV + 0,025PV + 0,013TPV \quad \text{Equação 3}$$

$$R^2 = 0,9104$$

em que  $R_{ole}$  é o rendimento de oleuropeína nos extratos (%),  $T$  é a temperatura,  $P$  é a pressão e  $V$  é a vazão do solvente.

Trabalhos que utilizaram PLE em modo contínuo para extração de compostos de *O. europaea* não foram encontrados na literatura para comparar os resultados. Em estudo com PLE de modo estático (XYNOS et al., 2012) encontraram resultados semelhantes no teor de oleuropeína dos extratos (7,3 a 16,4%), utilizando água e etanol como solventes, sendo que o etanol puro foi melhor. Em outros trabalhos em PLE de modo estático a temperatura foi um parâmetro significativo no processo, influenciando positivamente no rendimento do extrato e negativamente no teor de oleuropeína (XYNOS et al., 2014). A extração em modo contínuo tem a vantagem de introdução de solvente fresco no sistema, o que ajuda a manter um equilíbrio de extração favorável durante o processo, podendo ser controlado o fluxo de solvente, mantendo a mesma pressão na célula de extração (PURCARO, MORET & CONTE, 2014).

Rendimento de 5,8% de extrato foi alcançado por Lozano-Sánchez, Castro-Puyana & Mendiola, 2014 utilizando temperatura de 120 °C e composição de etanol : água de 50:50 v/v, nessas condições os autores também observaram maior teor de compostos fenólicos do resíduo da extração de azeite de oliva usando PLE.

Esses resultados demonstram que o trabalho traz contribuições para literatura em relação aos parâmetros a serem ajustados para extração da oleuropeína das folhas de oliveira na PLE de modo contínuo. A temperatura um pouco mais elevada aumenta o rendimento da extração, porém, o teor de oleuropeína no extrato não se altera. As técnicas verdes de extração como SFE ou PLE foram consideradas mais eficientes para extrair compostos com menor polaridade em folhas de oliveira, sendo considerados processos mais ecológicos (TAAMALLI et al., 2012).

A tecnologia verde é usada para extração de oleuropeína em outros trabalhos, por exemplo, a extração supercrítica com CO<sub>2</sub> e etanol como co-solvente (XYNOS et al., 2012). Resultados interessantes (36% de oleuropeína) foram obtidos por Baldino et al. (2017) usando temperatura de 35 °C e pressão de 150 bar em extração de antissolventes supercríticos (SAE) num processamento híbrido formado pela extração tradicional de etanol das folhas de oliveira, seguido de precipitação SAE. Estudos nesse sentido são importantes para se aperfeiçoar os parâmetros e melhorar as condições de extração para obtenção de maior teor de oleuropeína com economia de energia, diminuindo a contaminação do meio ambiente e desperdício de solventes (PURCARO, MORET & CONTE, 2014).

Outros métodos de extração, como ultrassom (XIE et al., 2015), extração com solvente hidroalcolólico (COPPA et al., 2017) e maceração (JIMENEZ et al., 2011) demonstraram alguns resultados interessantes para obtenção de oleuropeína de folhas de *O. europaea*.

### **5.3 Determinação dos componentes fenólicos totais**

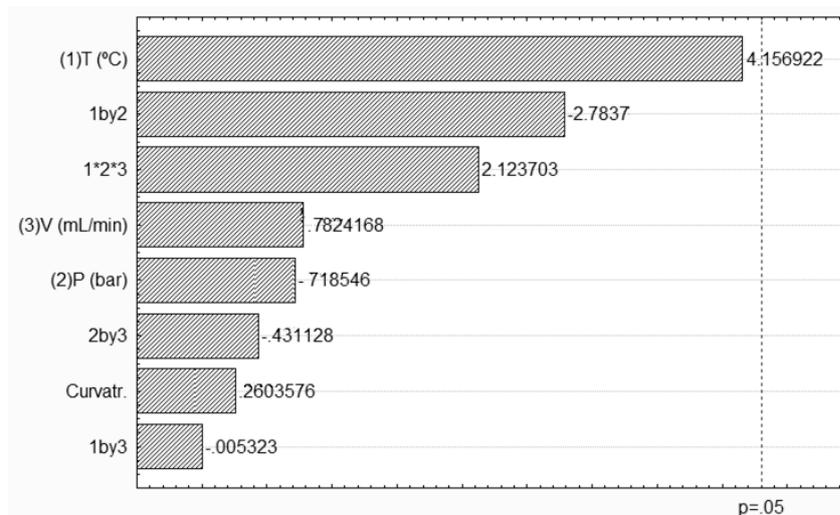
Nos extratos obtidos, os componentes fenólicos totais em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato são mostrados na Tabela 8. Pelos resultados da análise de variância verifica-se que nenhum dos fatores foi significativo na extração desses componentes, como também suas interações ( $p > 0,05$ ). Pelo gráfico de Pareto (Figura 20), nenhuma das barras ultrapassa o p valor: 0,05 no gráfico.

Os compostos fenólicos podem ser ativos como antioxidantes agindo por diferentes vias potenciais sendo a mais importante por eliminação de radicais livres, na qual o fenol pode quebrar a reação em cadeia dos radicais livres (BRIANTE et al., 2003; LEE & LEE, 2010). Nesse contexto, os valores obtidos são interessantes para um posterior uso do extrato para enriquecimento de alimentos. Por exemplo, pesquisas sobre polifenóis em estudos com animais e humanos mostraram que esses compostos possuem efeito benéfico para saúde, por suas propriedades que previnem doenças e o envelhecimento, incluindo atividades antiinflamatórias, antioxidantes e estrogênicas (LANDETE, 2012).

**Tabela 8:** Componentes fenólicos totais em mg equivalente ácido gálico por gramas de extrato das folhas dos extratos de folhas de oliveira obtidos em diferentes condições de extração com etanol pressurizado.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão de solvente (mL/min)	Fenólicos totais (mg EAG/g de extrato)
30	100	0,50	10,50 ± 0,39
30	200	0,50	11,67 ± 0,37
30	100	1,00	11,34 ± 0,37
30	200	1,00	11,22 ± 0,30
45	150	0,75	11,77 ± 0,39
60	100	0,50	12,78 ± 0,47
60	200	0,50	11,48 ± 0,35
60	100	1,00	12,55 ± 0,57
60	200	1,00	12,10 ± 0,24

Média ± desvio padrão.



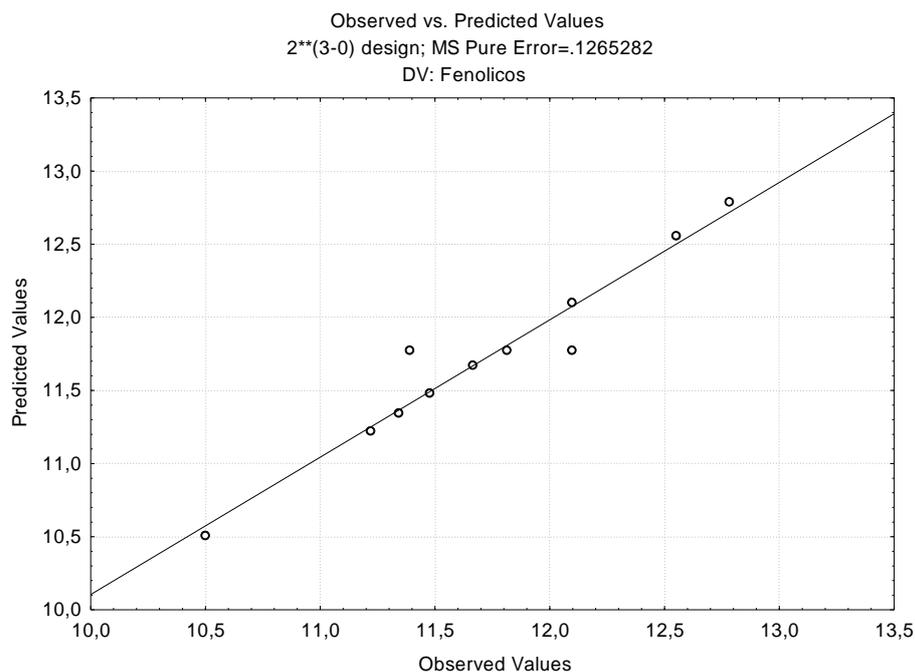
**Figura 20:** Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre fenólicos totais nos extratos obtidos por etanol pressurizado.

A Equação 4 mostra o modelo de regressão linear obtido pela análise estatística para as variáveis. O gráfico dos valores preditos *versus* observados mostra o ajuste dos dados ao modelo (Figura 21), o valor de  $R^2$  obtido foi de 0,9392.

$$FT = 8,56 - 0,081T - 0,084P + 0,013V + 0,128TP - 0,092TV + 0,025PV + 0,013TPV \quad \text{Equação 4}$$

$$R^2 = 0,9392$$

em que  $FT$  são fenólicos totais (mg EAG/g de extrato),  $T$  é a temperatura,  $P$  é a pressão e  $V$  é a vazão do solvente.



**Figura 21:** Valores preditos *versus* observados dos componentes fenólicos totais (mg EAG/g de extrato) dos extratos de folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado.

Utilizando outras formas de extração, Le Floch et al., 1998 obtiveram componentes fenólicos das folhas de oliveira por extração supercrítica nas seguintes condições: solvente dióxido de carbono (10% de metanol), pressão de 334 bar, 100 °C de temperatura e vazão de solvente de 2 ml min<sup>-1</sup> durante 140 min. Os autores, no entanto, obtiveram uma concentração total baixa de fenólicos (7,6 mg g<sup>-1</sup>) e quando o solvente foi apenas metanol a concentração foi de 16,8 mg g<sup>-1</sup>. O metanol é considerado um bom solvente para extrair a oleuropeína e outros compostos fenólicos. Porém, esse solvente possui alta toxicidade e pode comprometer a utilização dos extratos em alimentos (COPPA et al., 2017).

Utilizando o metanol como solvente Şahin & Bilgin, (2012) obtiveram resultados de fenólicos totais entre 10,11 - 61,66 mg EAG/g de folha seca de oliveira utilizando técnicas de homogeneização e 7,35 - 38,66 mg EAG/g de folha seca na extração por ultrassom. Resultados de componentes fenólicos entre 5,18 e 20,31 mg GAE/ g de extrato de oliveira foram obtidos por Sahin & Samli (2013) usando extração assistida por ultrassom, os autores também concluíram que a melhor condição para extração foi a de concentração de 50% etanol/água, 10 mL de solvente e 60 min de tempo de extração.

Observa-se que há uma grande variação dos resultados de fenólicos em folhas de *O. europaea* encontrados na literatura. Alguns se aproximam dos resultados encontrados nesse trabalho, no entanto podem ocorrer grandes variações dos compostos fenólicos de acordo com a cultivar, época de coleta, clima e condições de cultivo das oliveiras (COPPA et al., 2017).

#### 5.4 Determinação da Atividade Antioxidante

Na Tabela 9 são apresentados os resultados de atividade antioxidante  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) referentes aos extratos obtidos pelas diferentes condições de extração com etanol pressurizado. Os resultados são expressos em  $IC_{50}$ , que é a concentração inibitória de antioxidantes capaz de inibir 50% do radical livre DPPH. Quanto menor o valor de  $IC_{50}$ , maior teor de antioxidantes possui o extrato. Os resultados mostraram um bom potencial antioxidante dos extratos, os valores variaram de 29,27 a 45,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , na temperatura de 30 °C os resultados foram melhores (29,27 a 36,33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

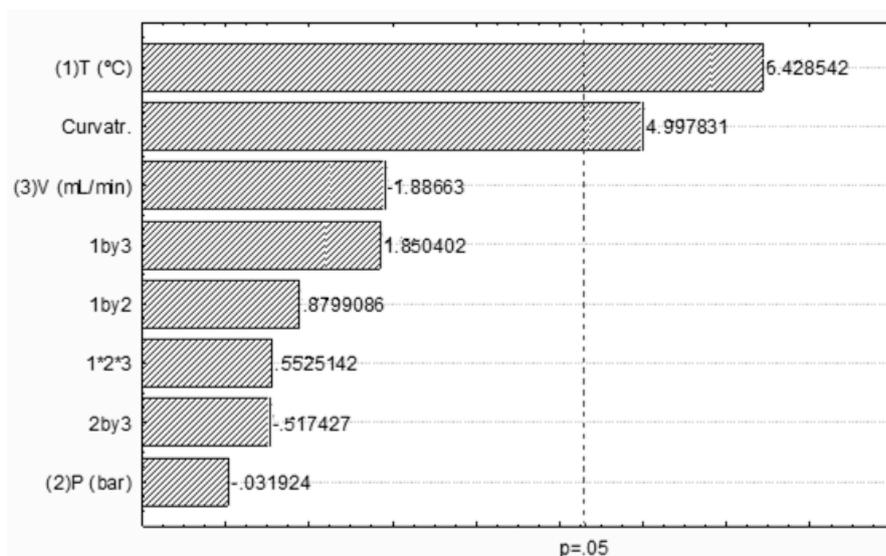
**Tabela 9:** Atividade antioxidante expressa em  $IC_{50}$  pelo método DPPH, dos extratos de folhas de oliveira obtidos em diferentes condições de extração com etanol pressurizado.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Vazão de solvente (mL/min)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
30	100	0,50	36,10 ± 2,55
30	200	0,50	36,33 ± 1,65
30	100	1,00	32,18 ± 8,19
30	200	1,00	29,27 ± 2,62
45	150	0,75	45,22 ± 1,33
60	100	0,50	42,35 ± 2,19
60	200	0,50	43,54 ± 0,73
60	100	1,00	42,24 ± 0,41
60	200	1,00	43,54 ± 0,64

Média ± desvio padrão.  $IC_{50}$ : Concentração do extrato necessária para diminuir em 50% a concentração do radical DPPH.

O diagrama de Pareto mostra que a temperatura foi um parâmetro significativo para antioxidantes (Figura 22), em menores temperaturas de extração foi possível obter maior teor

de antioxidantes nos extratos. A Equação 5 demonstra o modelo de regressão linear obtido pela análise estatística para as variáveis. O gráfico dos valores preditos *versus* observados mostra o ajuste dos dados ao modelo (Figura 23), mostrando um bom ajuste dos dados ao modelo. O valor de  $R^2$  obtido foi de 0,9739.

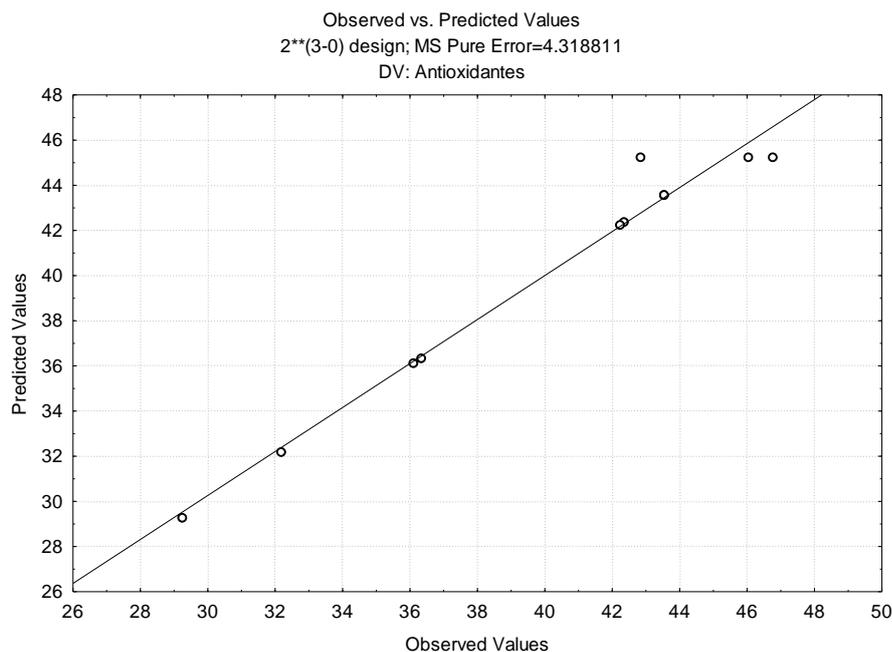


**Figura 22:** Diagrama de Pareto para efeito das variáveis independentes sobre a atividade antioxidante nos extratos obtidos por etanol pressurizado.

$$DPPH IC_{50} = 38,19 + 4,72T - 0,02P - 1,39V + 0,65TP + 1,35TV - 0,38PV + 0,40TPV \quad \text{Equação 5}$$

$$R^2 = 0,9739$$

Onde  $DPPH IC_{50}$  é atividade antioxidante dos extratos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura,  $P$  é a pressão e  $V$  é a vazão do solvente.



**Figura 23:** Valores preditos *versus* observados dos antioxidantes (IC<sub>50</sub>) dos extratos de folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado.

A atividade antioxidante dos extratos não foi correlacionada com o conteúdo fenólico total dos extratos das folhas de oliveira em trabalhos anteriores (XYNOS et al., 2014), bem como neste trabalho. Mesmo sendo a oleuropeína o principal composto fenólico nas folhas de oliveira, as interações entre os diversos constituintes é o que provavelmente define o comportamento antioxidante dos extratos (MYLONAKI et al., 2008).

Resultados de Xynos et al. (2014) mostraram IC<sub>50</sub> de 118,8 µg mL<sup>-1</sup> em PLE modo estático (40 °C, 100% de etanol para um ciclo de extração) de folhas de oliveira em pó, apresentando menor potencial antioxidante em relação aos encontrados nesse trabalho. Usando PLE e etanol como solvente, Herrero et al. (2011) alcançaram IC<sub>50</sub> de 27,4 a 52,7 µgmL<sup>-1</sup>, resultados que se aproximam dos encontrados nesse trabalho. Dados variando de 86,31 a 97,97% de inibição do radical DPPH foram obtidos por Sahin & Samli, 2013 em extração assistida por ultrassom das folhas de oliveira, utilizando etanol/água como solvente. Em estudo com extrato comercial de folhas de oliveira (Irlanda) Hayes et al., 2011 obtiveram IC<sub>50</sub> de 34,58 µg mL<sup>-1</sup>.

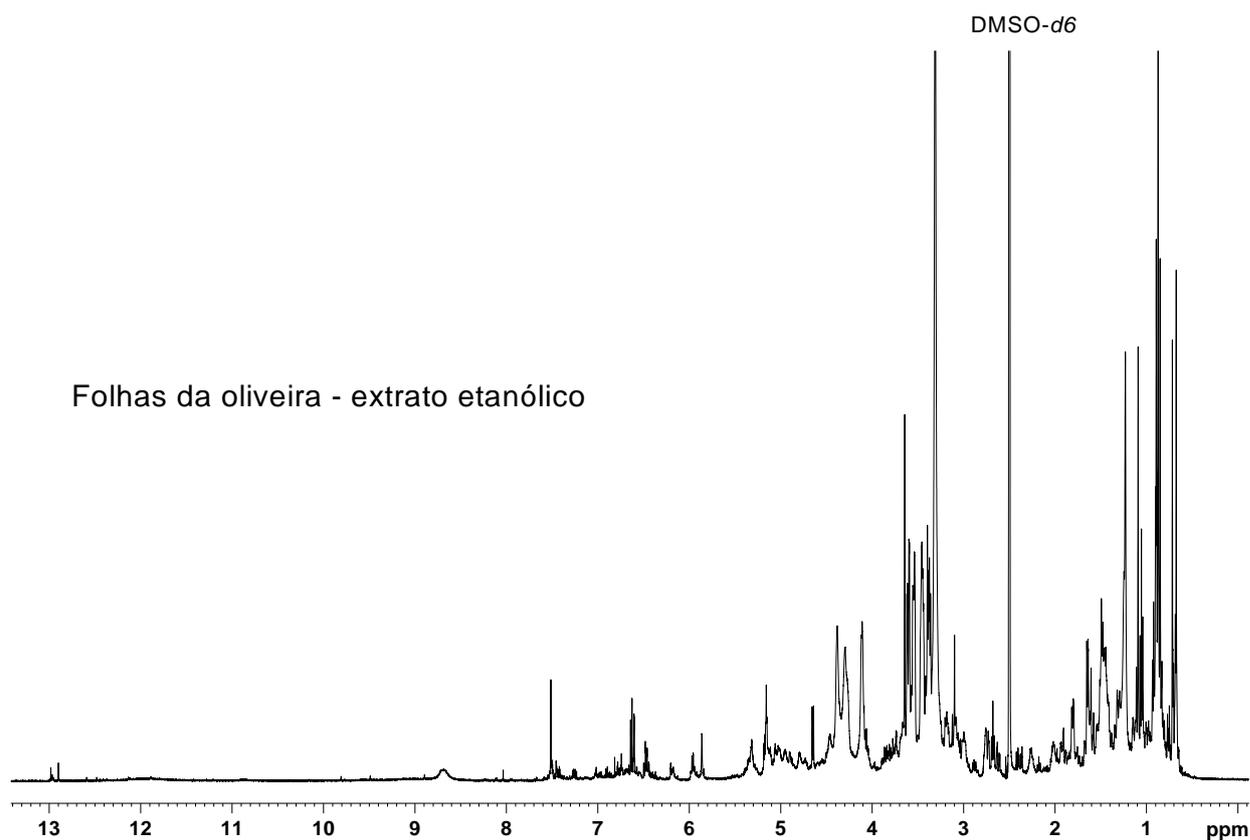
O uso de extrato de folhas de oliveira rico em oleuropeína, outros compostos fenólicos e antioxidantes é promissor para o enriquecimento do azeite de oliva, por exemplo, aumentando a sua composição de polifenóis e a sua estabilidade oxidativa (COPPA et al., 2017; JIMENEZ

et al., 2011). Isso demonstra a importância da obtenção de extratos limpos a partir de matéria prima de baixo custo, para posterior uso no enriquecimento de alimentos e melhora da saúde através do consumo de antioxidantes não sintéticos.

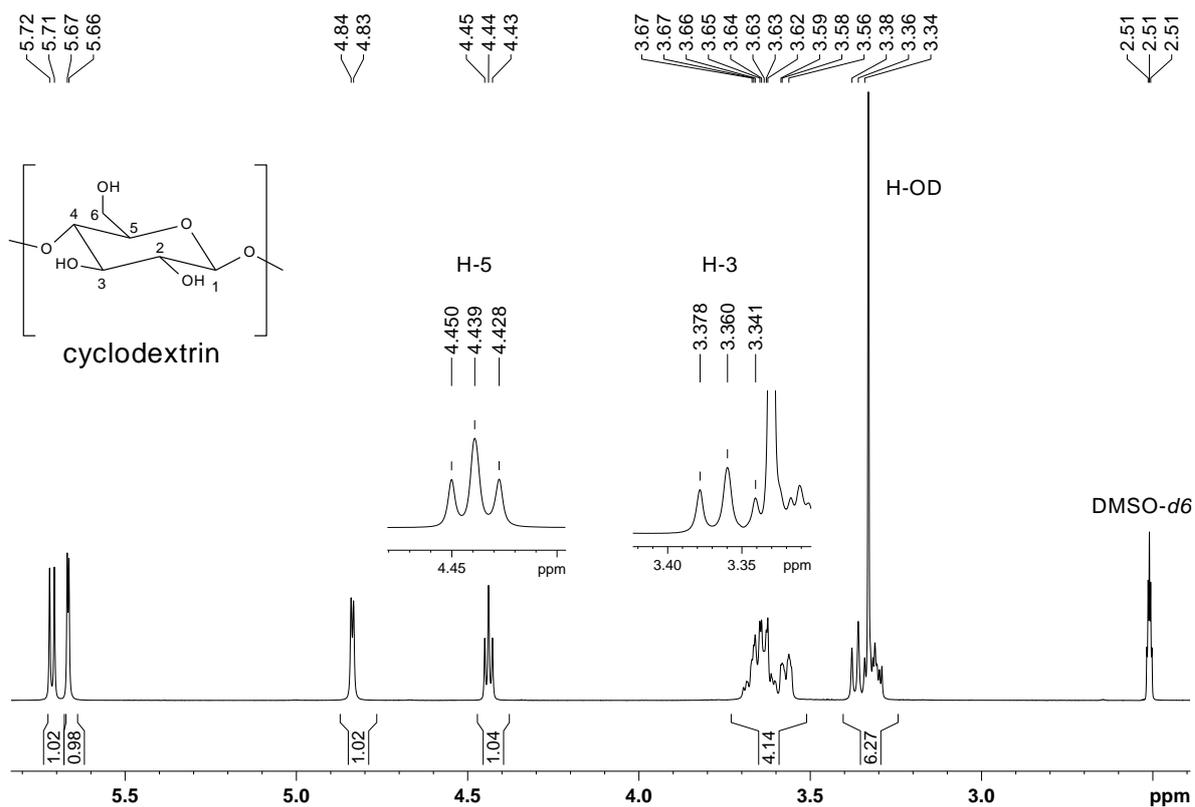
## 5.5 Caracterização dos microencapsulados/complexos de Inclusão

### 5.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato das folhas de oliveira (EP) e do receptor  $\beta\text{-CD}$ , são apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.



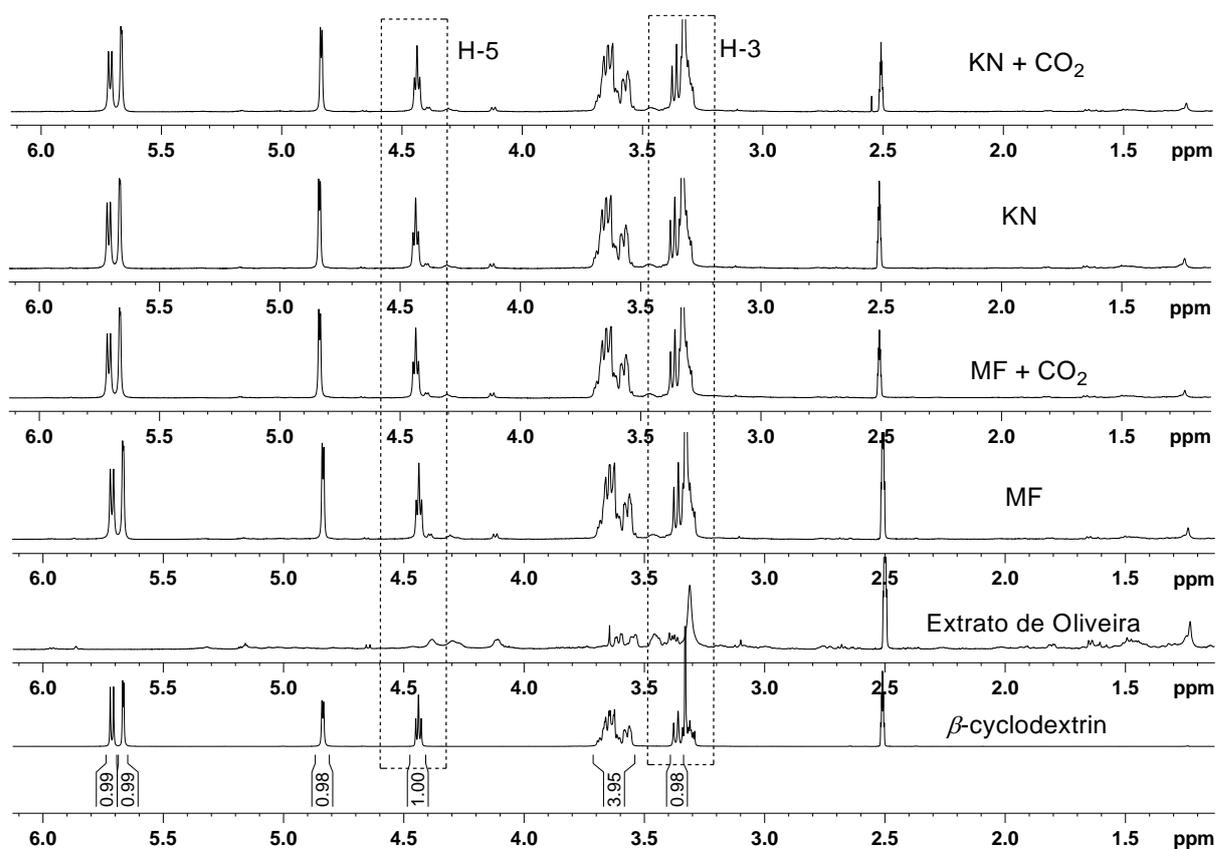
**Figura 24:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato das folhas de oliveira (EP) em DMSO- $d_6$ .



**Figura 25:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da β-ciclodextrina em DMSO-d<sub>6</sub>.

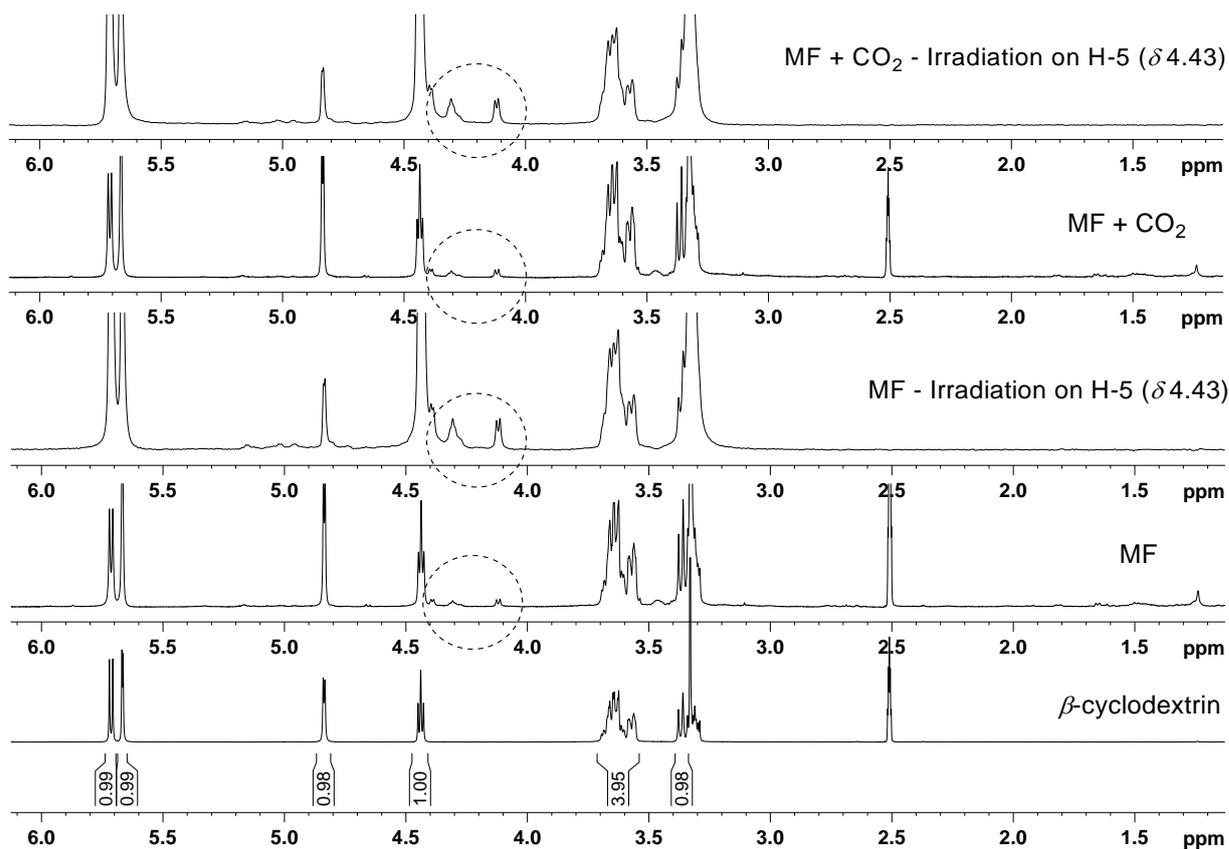
De acordo com a literatura (FRACETO et al, 2007), a β-CD apresenta dois sítios de interação, um externo hidrofóbico e outro interno hidrofílico. Quando ocorre o encapsulamento de moléculas os hidrogênios H-3 e H-5 sofrem alterações em seus ambientes químicos. Essas alterações são detectadas por RMN através de variações no deslocamento químico ( $\delta$ ), interações espaciais (efeito *nuclear Overhauser* - NOE), tempos de relaxação ( $T_1$  e  $T_2$ ) e perfis de difusão. Os sinais dos hidrogênios H-3 e H-5 da β-CD são observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 25), respectivamente em  $\delta$  3,36 (*dd*,  $J = 9,4$  e  $9,2$  Hz) e  $\delta$  4,43 (*dd*,  $J = 5,9$  e  $5,5$  Hz).

A Figura 26 apresenta um comparativo entre os espectros das seis amostras avaliadas. O intuito foi verificar possíveis alterações nos deslocamentos químicos da β-CD após a possível encapsulação do extrato de oliveira. As variações nos valores de deslocamento químico da β-CD são sutis nas quatro amostras de interação com o extrato. Essas alterações podem refletir tanto a interação entre os dois compostos, bem como as variações da concentração da β-CD nas misturas quando comparada a amostra pura. Devido ao número de fatores que podem alterar os valores de  $\delta$  de uma molécula (solvente, concentração, pH, temperatura, etc.) esse parâmetro se mostra impreciso na comprovação da interação β-CD e molécula hóspede.

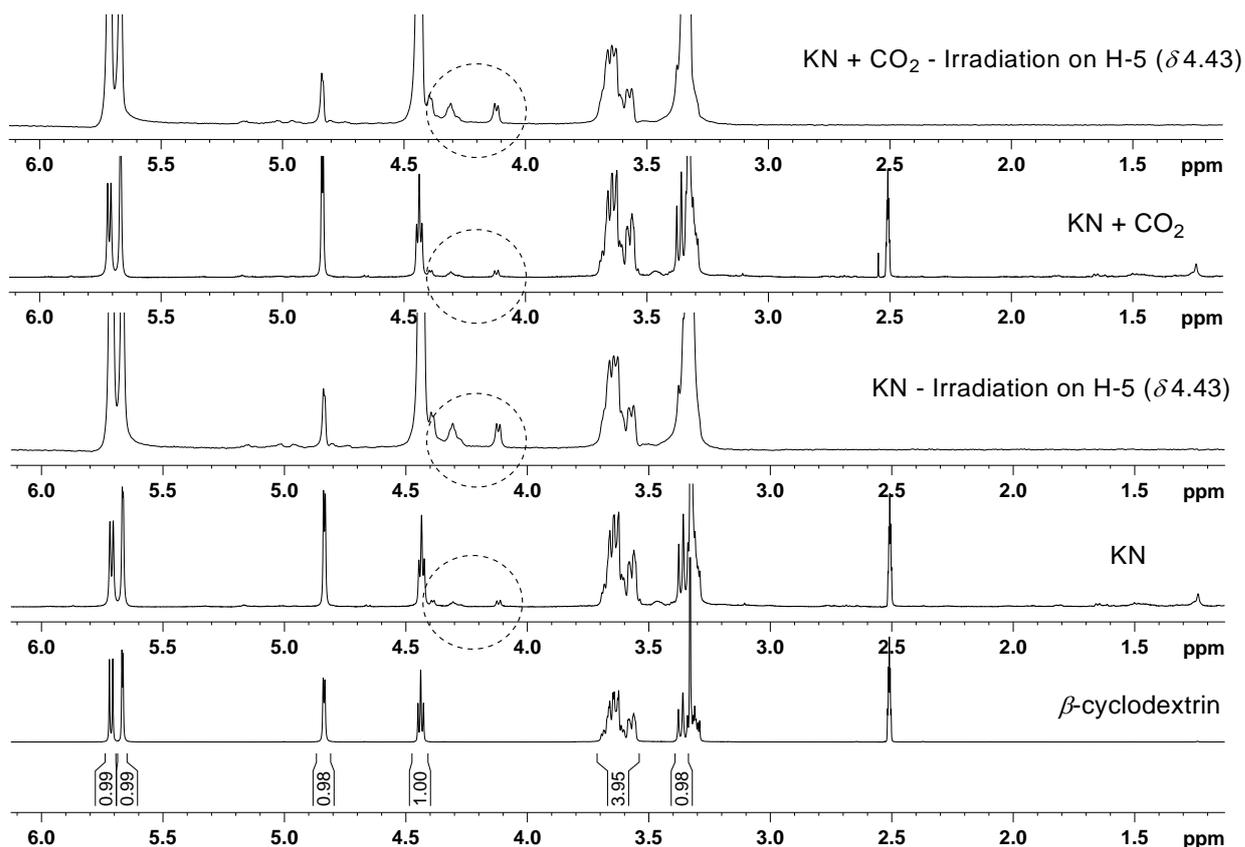


**Figura 26:** Superposição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\beta$ -CD, extrato de oliveira e interações (MF, MF+CO<sub>2</sub>, KN e KN+CO<sub>2</sub>).

Um método mais seguro de verificação da encapsulação do extrato de oliveira na  $\beta$ -CD foi realizado através do efeito nuclear Overhauser (NOE). A irradiação seletiva de sinais da  $\beta$ -CD resulta na transferência de polarização entre hidrogênios espacialmente próximos, quer seja da própria molécula ou da molécula hospede (extrato de oliveira), resultando no aumento da intensidade dos sinais dos hidrogênios que receberam polarização. Para avaliar esses efeitos, foram realizados experimentos NOESY-1D, irradiando-se os hidrogênios H-5 ( $\delta$  4,43) da  $\beta$ -CD, cujos resultados são apresentados nas Figuras 27 e 28.

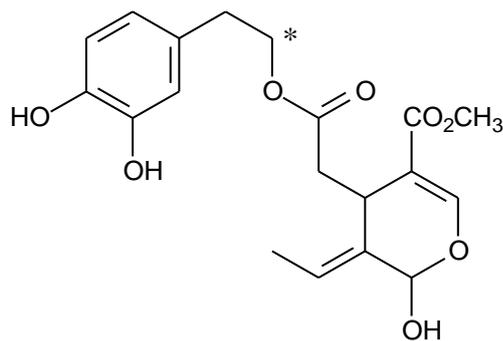


**Figura 27:** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H das amostras MF e MF+CO<sub>2</sub>, demonstrando o efeito da irradiação seletiva (NOE) do hidrogênio H-5 da β-CD nas amostras MF e MF+CO<sub>2</sub>. Em destaque hidrogênios que tiveram a intensidade aumentada pelo efeito NOE.



**Figura 28:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras KN e KN+CO<sub>2</sub>, demonstrando o efeito da irradiação seletiva (NOE) do hidrogênio H-5 da  $\beta$ -CD nas amostras KN e KN+CO<sub>2</sub>. Em destaque hidrogênios que tiveram a intensidade aumentada pelo efeito NOE.

Conforme pode-se observar nas Figuras 27 e 28, a irradiação do hidrogênio H-5 da  $\beta$ -CD resultou no aumento da intensidade dos sinais duplete em  $\delta$  4,12 ( $J = 7.1$  Hz) e tripleto em  $\delta$  4,31 ( $J = 5.5$  Hz). Destaca-se que esse tripleto possui deslocamento químico típico de hidrogênios acilcarbinólicos, como os destacados com um asterisco na estrutura da oleorupeína (Figura 29). O aumento na intensidade indica interação espacial entre os hidrogênios H-5 da  $\beta$ -CD e os dois hidrogênios do extrato da oliveira. Dessa forma, essa interação indica o sítio de interação entre  $\beta$ -CD e a molécula hóspede.

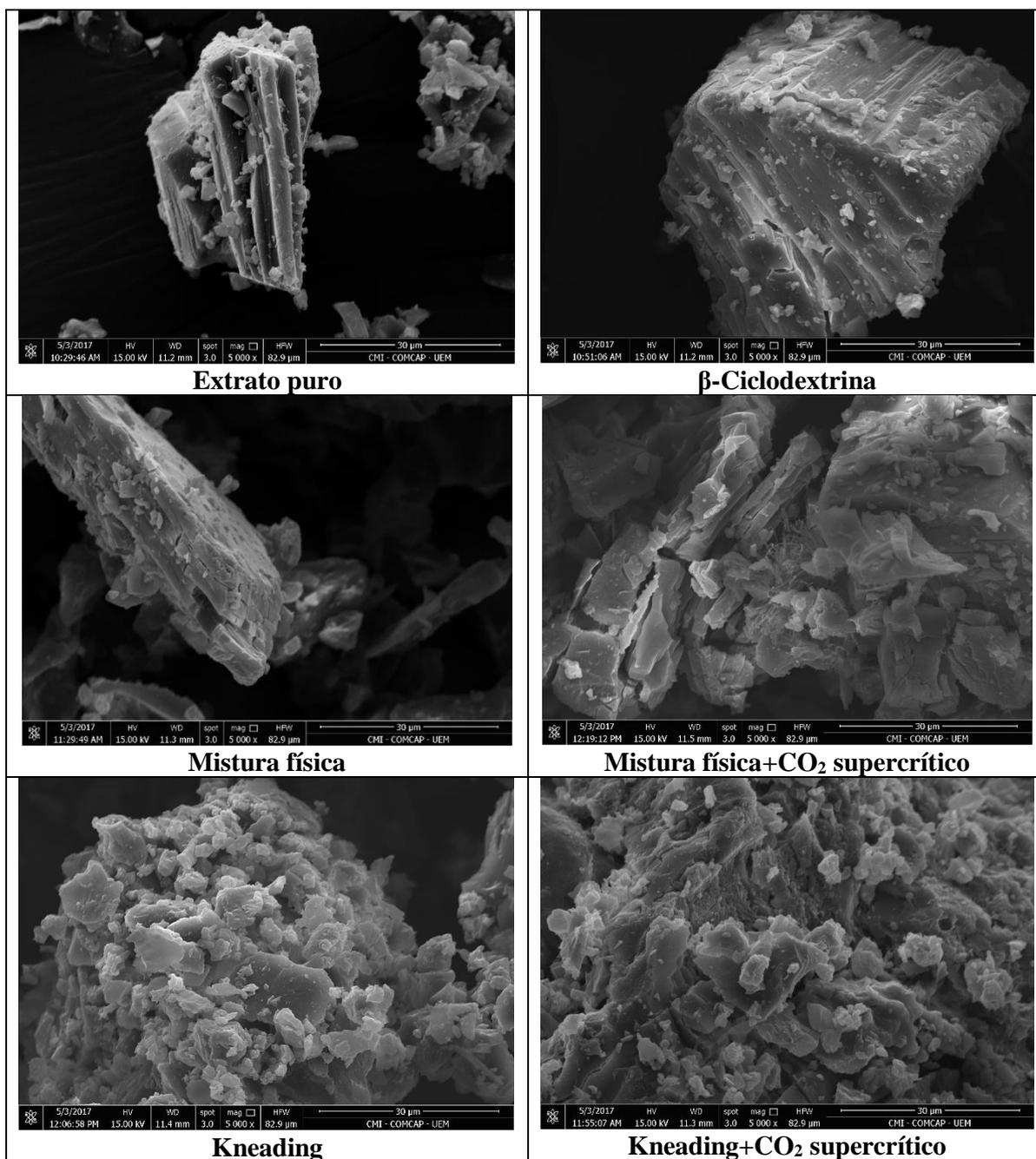


**Figura 29:** Estrutura da oleuropeína. Em destaque (asterisco) hidrogênios acilcarbinólicos, que possuem deslocamento químico na região de  $\delta$  4,3.

#### 5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura das substâncias puras e dos complexos são mostradas na Figura 30, onde observam-se mudanças de morfologias das amostras quando comparadas as substâncias puras e as misturas, essas mudanças nas estruturas cristalinas das amostras indicam possivelmente a formação de complexos de inclusão (MORAES et al., 2007; YALLAPU, JAGGI & CHAUHAN, 2010). No kneading as partículas parecem mais aglomeradas, isso pode ser devido a adição da água no preparo. O CO<sub>2</sub> supercrítico não parece ter influenciado na morfologia das amostras, se comparadas as amostras MF com MF+CO<sub>2</sub> e KN com KN+CO<sub>2</sub> (Figura 30).

Os dados corroboram com trabalho de Yallapu, Jaggi & Chauhan (2010) que fizeram inclusão de curcumina em  $\beta$ -CD, onde a aparente mudança morfológica de estruturas em forma de flocos para agregados menores foi atribuída ao encapsulamento de curcumina nas cavidades de CD em complexos de CD-CUR (YALLAPU, JAGGI & CHAUHAN, 2010).

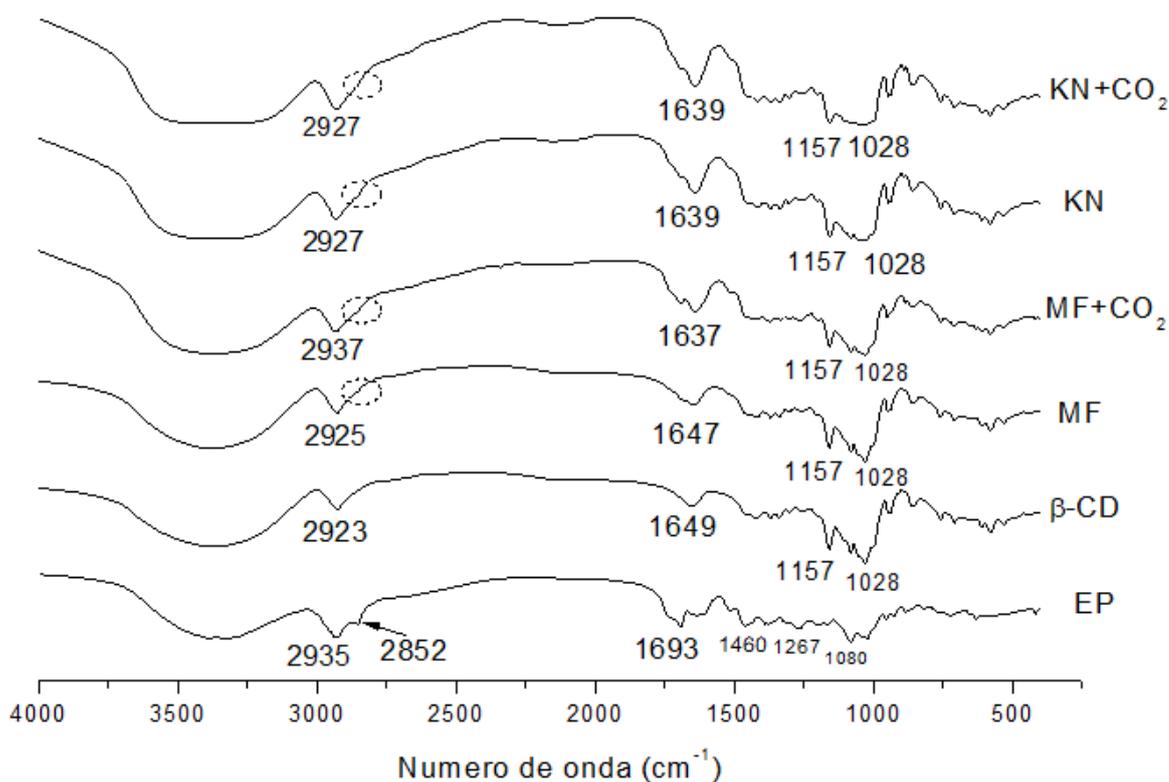


**Figura 30:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das substâncias puras ( $\beta$ -Ciclodextrina e extrato das folhas de oliveira) e dos microencapsulados/complexos de  $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de folhas de oliveira.

#### 5.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para interpretar as análises de FT-IR foram observados os deslocamentos das bandas de absorção da  $\beta$ -ciclodextrina, onde podem ocorrer interações entre grupos de átomos da molécula da substância hóspede e da  $\beta$ -CD (LIMA et al., 2012).

Na Figura 31 estão os espectros de FT-IR de todas as substâncias (hóspede e hospedeira) mostrando as bandas de absorção. O pico a  $2935\text{ cm}^{-1}$  do extrato puro pode ser atribuído a vibrações de alongamento de grupos funcionais -CH de -CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub> (AWWAD & FARHAN, 2012). A banda de alongamento C-H em  $1460\text{ cm}^{-1}$ , característico de grupos metila (PAVIA, 2010), e na região de  $2852\text{ cm}^{-1}$  são bandas características da oleuropeína. O pico a  $1693\text{ cm}^{-1}$  é característico de alongamento C = O (HIZAL, 2006). O alongamento C-O em fenóis produz picos na região de  $1300\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  (HIZAL, 2006). Esta banda apareceu a  $1267\text{ cm}^{-1}$  no espectro do extrato puro das folhas de oliveira. A banda a  $1080\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída as vibrações C-OH da proteína na folha de oliveira (KHALIL, ISMAIL & EL-MAGDOUB, 2012).



**Figura 31:** Espectros na região do infravermelho das substâncias puras ( $\beta$ -Ciclodextrina e extrato das folhas de oliveira) e dos microencapsulados/complexos de  $\beta$ -Ciclodextrina e extrato de folhas de oliveira. EP: extrato de folhas de oliveira puro;  $\beta$ -CD:  $\beta$ -Ciclodextrina pura; MF: Mistura física; MF+CO<sub>2</sub>: Mistura física + CO<sub>2</sub> supercrítico; KN: Kneading; KN + CO<sub>2</sub>: Kneading + CO<sub>2</sub> supercrítico.

O espectro da  $\beta$ -ciclodextrina mostrou picos em  $2923\text{ cm}^{-1}$ , atribuído a estiramento C – H, em  $1157\text{ cm}^{-1}$  característico de estiramento C – O e em  $1028\text{ cm}^{-1}$  atribuído a unidades de glicose C – O – C (AGUIAR et al., 2014; SAMBASEVAM et al., 2013). O pico a  $1649\text{ cm}^{-1}$  corresponde a HOH (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2010) (Figura 31).

Os espectros dos complexos de inclusão mostraram picos possivelmente referentes a presença da oleuropeína, destacados na Figura 31. Houve um deslocamento dos picos para maior frequência em todos os complexos, quando se observa o pico a  $2923\text{ cm}^{-1}$  da  $\beta$ -CD. A banda a  $1649\text{ cm}^{-1}$  também foi deslocada nos espectros de todos os complexos para menor frequência, sendo que o pico de MF + CO<sub>2</sub> supercrítico teve o maior deslocamento, para  $1637\text{ cm}^{-1}$ . Esse deslocamento de picos que ocorre em complexos de inclusão indica forte interação física entre a molécula hóspede e hospedeira, confirmando a formação do complexo de inclusão no estado sólido, como observado por outros autores (AGUIAR et al., 2014; SAMBASEVAM et al., 2013; EID et al., 2011; YALLAPUA 2010; ALEEM et al. 2008).

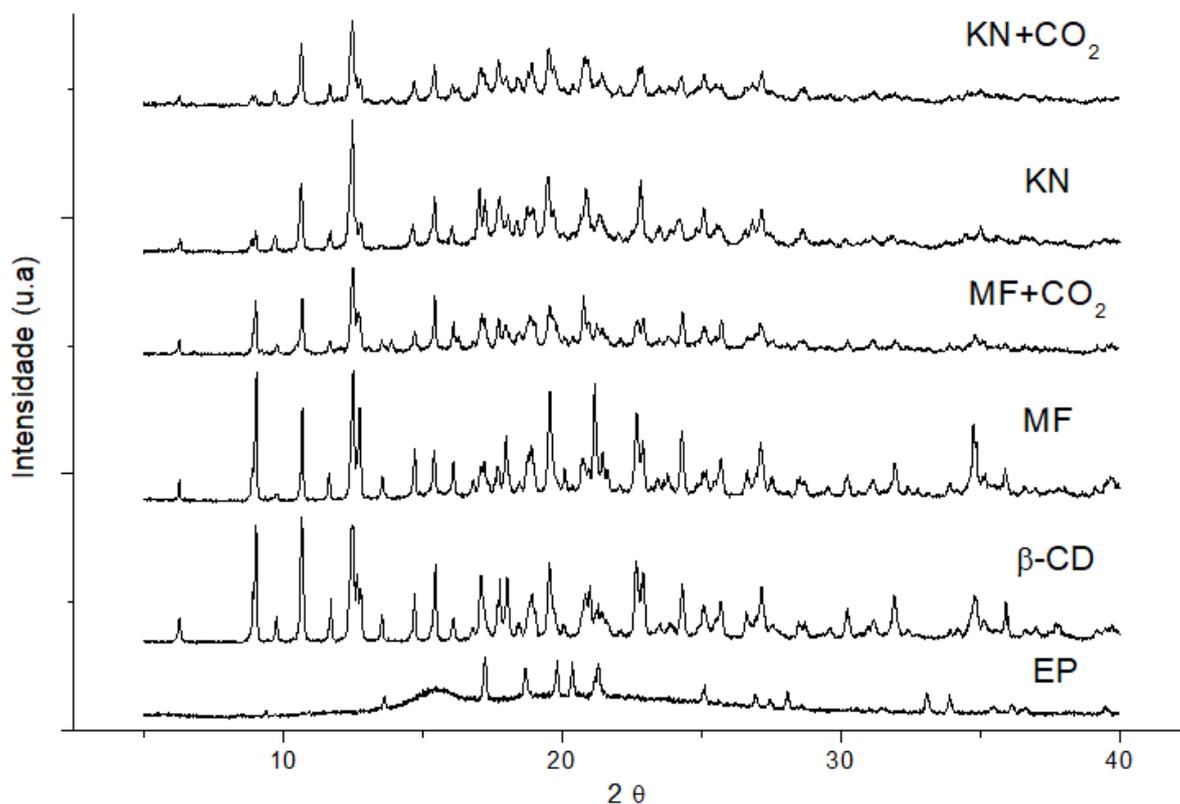
Os picos a  $1028\text{ cm}^{-1}$  reduziram sua intensidade nos complexos, mais intensamente em KN e KN + CO<sub>2</sub> (Figura 30). Estudos mostraram que a inserção de uma molécula-hóspede no interior da cavidade da  $\beta$ -CD reduz a livre movimentação das moléculas encapsuladas, reduzindo a intensidade do sinal devido a uma restrição conformacional que ocorre (SAMBASEVAM et al., 2013; EID et al., 2011; ALEEM et al. 2008).

#### **5.4.4 Difração de Raios X (DRX)**

Os difratogramas obtidos são mostrados na Figura 32. Através das diferenças nas amostras, como surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, podem ser considerados indícios de formação de complexos de inclusão entre a  $\beta$ -CD e o extrato (CAO et al., 2005).

Na Figura 32, os principais picos da molécula de  $\beta$ -Ciclodextrina foram identificados em  $2\theta$  igual a  $6,32^\circ$ ,  $9,06^\circ$ ,  $10,67^\circ$  e  $12,48^\circ$ . Foi também observado que não houve ruptura da rede cristalina da  $\beta$ -Ciclodextrina após inclusão da molécula hóspede (Extrato de oliveira) pelos métodos de mistura física (MF e KN), ou seja, o mapa cristalográfico da molécula hospedeira permaneceu inalterado, assim como identificado por Cortes et al., 2001. A notável discrepância entre os mapas cristalográficos da amostra pura de  $\beta$ -Ciclodextrina e suas inclusões são as

reduções da cristalinidade, ou seja, da intensidade dos picos, após os procedimentos de inclusão, e esta informação pode dar uma margem da interpretação de que ocorreu a inclusão do extrato de oliveira na  $\beta$ -Ciclodextrina (WINTERS, YORK & TIMMINS, 1997), no entanto sem ocorrer amorfização ou formação de novas fases. As inclusões KN+CO<sub>2</sub> e MF+CO<sub>2</sub> apresentaram aparente maior redução da cristalinidade, no entanto, os difratogramas são semelhantes (Figura 32).



**Figura 32:** Gráfico de Difração de Raios X das substâncias puras e das misturas/complexos de inclusão. EP: extrato de folhas de oliveira puro;  $\beta$ -CD:  $\beta$ -Ciclodextrina pura; MF: Mistura física; MF+CO<sub>2</sub>: Mistura física + CO<sub>2</sub> supercrítico; KN: Kneading; KN + CO<sub>2</sub>: Kneading + CO<sub>2</sub> supercrítico.

O DRX do extrato das folhas de oliveira apresentou-se na forma amorfa, com a predominância de alguns picos referentes a compostos fenólicos (9,49°, 13,7°, 20,4°, 28,13° e 33,2°) que apontam a presença da Oleuropeína.

Os picos referentes à molécula de oleuropeína não foram visualizados nas linhas de difração das amostras após procedimento de inclusão (MF, MF+CO<sub>2</sub>, KN e KN+CO<sub>2</sub>) devido

à baixa razão associada de 1:4 (Oleuropeína :  $\beta$ -Ciclodextrina), o que poderia tornar os picos da Oleuropeína imperceptíveis por conta da baixa intensidade apresentada em relação a presença massiva da molécula hospedeira, ou ainda devido à sobreposição dos picos.

### **5.5 Estabilidade oxidativa em Rancimat**

A estabilidade oxidativa é demonstrada em horas, que correspondem ao período de indução, esse período é o tempo necessário para que os compostos formados no processo de oxidação sejam perceptíveis (HILL, 1994).

Na Tabela 10 pode-se observar os tempos de indução obtidos no equipamento. Quando a concentração dos microencapsulados foi mais baixa (200 mg/kg de azeite) não houve aumento no tempo de indução. Quando a concentração dos microencapsulados foi aumentada para 500 mg/kg de azeite, observa-se um aumento de aproximadamente duas horas no tempo de indução dos tratamentos MF (18,53 h), MF+ CO<sub>2</sub> (18,00 h) e KN+ CO<sub>2</sub> (18,00 h) se comparados à testemunha (azeite puro). Esses dados corroboram com Coppa et al. (2107), que também obtiveram aumento de duas horas no tempo de indução de azeite comum com a adição de extratos das folhas de oliveira. Os tratamentos com extrato puro (EP) e kneading (KN) na concentração de 500 mg/kg de azeite não interferiram no tempo de indução (Tabela 10).

**Tabela 10:** Estabilidade oxidativa obtida no aparelho Rancimat, de azeite de oliva, com e sem a adição de extrato de oliveira e microencapsulados de extrato de oliveira. EP: extrato de folhas de oliveira puro; MF: Mistura física; MF+CO<sub>2</sub>: Mistura física + CO<sub>2</sub> supercrítico; KN: Kneading; KN + CO<sub>2</sub>: Kneading + CO<sub>2</sub> supercrítico.

Tratamento	Concentração do microencapsulado (mg/kg de azeite)	Tempo de indução (horas)
AP (Controle)	0	16,53
EP		16,55
MF		16,18
MF+CO <sub>2</sub>	200	16,23
KN		16,34
KN+SC		16,23
EP		16,81
MF		18,53
MF+ CO <sub>2</sub>	500	18,00
KN		16,54
KN+ CO <sub>2</sub>		18,00
EP		18,02
MF		18,15
MF+ CO <sub>2</sub>	1000	17,09
KN		17,76
KN+ CO <sub>2</sub>		17,48

O dobro da concentração de microencapsulados foi adicionada e o tempo de indução diminuiu para MF+ CO<sub>2</sub> (de 18,00 para 17,09 h) e KN+ CO<sub>2</sub> (de 18 para 17,48 h). Esses microencapsulados podem ter acelerado o processo de oxidação do azeite, o que não seria interessante nessas concentrações. Isso demonstra que o CO<sub>2</sub> supercrítico pode ter alterado algumas características do extrato após o processo de inclusão. Já para os tratamentos EP e KN houve aumento no tempo de indução com aumento da concentração. EP aumentou de 16,81 para 18,02 h e KN aumentou de 16,54 para 17,48 h, o tratamento MF não sofreu alteração com aumento da concentração de 500 para 1000 mg/kg de azeite (Tabela 10). Coppa et al. (2017)

dobraram a concentração do extrato de oliveira adicionado ao azeite e também não obtiveram vantagens no tempo de indução.

Alguns autores também obtiveram resultados interessantes no aumento da estabilidade oxidativa de óleos vegetais com a adição de antioxidantes naturais de extratos de plantas. O extrato de folhas de oliveira foi adicionado em azeite de oliva e aumentou o tempo de indução de 9 para 13,5 horas, para óleo de girassol aumentou de 17,5 para 21 horas e para óleo de palma aumentou de 17,5 para 21 horas o tempo de indução (SALTA et al., 2007). Jimenez et al. (2011) testaram diferentes tipos de extratos de folhas de oliveira (hidroalcoólico, prensagem e com CO<sub>2</sub> supercrítico) na estabilidade oxidativa de óleos de girassol, canola e soja, e concluíram que o extrato obtido por extração supercrítica foi mais eficiente para o aumento do período de indução nos óleos.

É crescente a demanda por esses antioxidantes naturais para substituição de antioxidantes sintéticos, que demonstram eficiência, porém, podem causar danos à saúde se ingeridos em maiores quantidades (DURÁN; PADILLA, 1993). Nesse contexto, a procura por antioxidantes naturais para aplicação em alimentos, cosméticos e fármacos sugere novas estratégias para aumentar a estabilidade oxidativa dos produtos (AHMAD-QASEM et al., 2013).

## 6. CONCLUSÕES

A melhor temperatura para obtenção de extrato das folhas de oliveira por PLE de modo dinâmico foi de 60 °C (rendimentos de variando de 14,53 a 15,06%), dentre as condições estudadas. Podendo ser usada uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e pressão de 100 bar, as mais baixas testadas nos experimentos, para uma economia de energia e solvente.

O rendimento de oleuropeína nos extratos variou de 8,05 a 8,92%. Os componentes fenólicos variaram de 10,50 ± 0,39 a 12,55 ± 0,57 mg EAG/g de extrato. Os parâmetros de temperatura, pressão e vazão de solvente não influenciaram no teor de oleuropeína e nos componentes fenólicos nas condições experimentais desse trabalho. A atividade antioxidante foi maior em extratos obtidos em temperatura de 30°C, vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e pressão de 100 bar.

Através das análises de caracterização dos microencapsulados e das substâncias puras foi possível concluir que houve aparente inclusão do extrato na β-CD, devido à grande interação entre as moléculas. As quatro formas de inclusão testadas tiveram resultados semelhantes nas análises de caracterização. A inclusão do extrato na β-CD influenciou na estabilidade oxidativa do azeite de oliva, na concentração 500 mg micrencapsulados/kg de azeite ocorreu aumento de aproximadamente duas horas no tempo de indução dos tratamentos MF (18,53 h), MF+ CO<sub>2</sub> (18,00 h) e KN+ CO<sub>2</sub> (18,00 h). O dobro da concentração de microencapsulados resultou em indução do tempo de inclusão para MF + CO<sub>2</sub> (de 18,00 para 17,09 h) e KN + CO<sub>2</sub> (de 18 para 17,48 h). A tecnologia supercrítica não é indicada nesse caso, por demandar maior gasto de energia, maior custo e maior dificuldade no processo de inclusão molecular.

A obtenção de extrato com etanol pressurizado apresenta baixa toxicidade ao meio ambiente e é promissora para obtenção de oleuropeína e outros compostos fenólicos das folhas de oliveira. A inclusão do extrato em β-CD demonstra potencial para interferir na biodisponibilidade dos componentes do extrato de oliveira.

Para trabalhos futuros a sugestão é que se use pressões mais baixas para avaliar o rendimento de extração, também temperaturas um pouco mais altas e maior variação da vazão do solvente. Outra sugestão é utilizar solvente hidroalcoólico para favorecer a extração de compostos fenólicos. A coleta do material de oliveira pode ser feita em diferentes épocas para avaliar a variação do teor de compostos fenólicos. As microcápsulas podem ser aplicadas em diferentes áreas, como em testes microbiológicos ou utilização na agricultura.

## REFERÊNCIAS

AFANEH, I.; YATEEM, H.; AL-RIMAWI, F. Effect of Olive Leaves Drying on the Content of Oleuropein. **American Journal of Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. February, p. 246–252, 2015.

AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com B-Ciclodextrina. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 804–809, 2014.

AHMAD-QASEM, M. H. et al. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. **Food Research International**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 189–196, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912004395>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

AL-AZZAWIE, H. F.; ALHAMDANI, M. S. S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 12, p. 1371–1377, 2006.

ALEEM, O. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 47, Issue 3, 15 July 2008, Pp. 535-540

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

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

AWWAD, A. M.; FARHAN, A. M. Equilibrium, Kinetic and Thermodynamics of Biosorption of Lead (II) Copper (II) and Cadmium (II) Ions from Aqueous Solutions

ontoOlive Leaves Powder. **American Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 238–244, 2012. Disponível em: <<http://article.sapub.org/10.5923.j.chemistry.20120204.09.html>>

BAKHOUCHE, A. **New Challenges In Analytical Determination Of Olive Oil Polyphenols. Potential Use As Markers Linked To Pedoclimatic, Agronomic And Technological Conditions**. University of Granada, [s. l.], 2015.

BALDINO, A. L. et al. Concentrated Oleuropein Powder from Olive Leaves using Alcoholic Extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.026>>

BARBARO, B. et al. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 18508–18524, 2014.

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

BECERRA-HERRERA, M. et al. Characterization and evaluation of phenolic profiles and color as potential discriminating features among Spanish extra virgin olive oils with protected designation of origin. **Food chemistry**. 2018 vol:241 pp. 328 -337.

BENDINI, A. et al. Phenolic Molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects. antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. **Molecules**, 12, 1679–1719, 2007.

BERGER-SCHUNN, A. **Practical color measurement**. New York: John Wiley & Sons, 1994. 192p.

BONOLI, M. et al. **J. Agric. Food Chem.** 2004, 52, 5195.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes. principios e métodos analíticos**. s.n. 2015

BOSKOU, D. **Olive Fruit, Table Olives, and Olive Oil Bioactive Constituents**. In: BOSKOU, D. Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. Urbana, Illinois. Ed. 1. 2015.

BOTSOGLU, E. et al. Olive leaves (*Olea europea* L.) and  $\alpha$ -tocopheryl acetate as feed antioxidants for improving the oxidative stability of  $\alpha$ -linolenic acid-enriched eggs. **Journal**

of **Animal Physiology and Animal Nutrition**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 740–753, 2013.

BOUDHRIOUA, N. et al. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 29, n. 2–3, p. 412–419, 2009.

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2005. Disponível em:<  
[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270\\_22\\_09\\_2005.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270_22_09_2005.html)> Acesso em: 17/01/2018

BRIANTE, R.; FEBBRAIO, F.; NUCCI, R. Antioxidant Properties of Low Molecular Weight Phenols Present in the Mediterranean Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 24, p. 6975–6981, 2003.

BULOTTA, S. et al. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 219, 2014. Disponível em:  
<<http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-014-0219-9>>

CABALLERO, J. M. et al. Variedades de oliveiras mais plantadas nos principais países produtores do mundo. In: OLIVEIRA, A. F. (Org.) **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. Cap. 5 p. 159-192.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **Analyst**, [s. l.], p. 1182–1193, 2001.

CAMERON, K. S.; FIELDING, L. N. M. R. Diffusion spectroscopy as a measure of host-guest complex association constants and as a probe of complex size. **Journal Org Chem**. 2001; 66(21):6891-5.

CAO F. et al. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Dev Ind Pharm**. 2005; 31(8):747-56.

CAPELLO, C. FISCHER, U. HUNGERBUHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents, **Green Chemistry**. 9 (9) 927–934, 2007.

CAPPATO, L. P.; FERREIRA, E. H. R.; ROSENTHAL A.. Azeitonas de mesa no Brasil: mercado, tecnologia e aspectos legais. **Ciência Rural** vol.45 no.7 Santa Maria July 2015 Epub May 05, 2015.

CARRASCO-PANCORBO, A. et al, Analytical determination of polyphenols in olive oils. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 837-858, 2005.

CAVALHEIRO, C. V. et al. Composição química de folhas de oliveira ( *Olea europaea* L . ) da região de Caçapava do Sul , RS Chemical composition of olive leaves ( *Olea europaea* L . ). [s. l.], p. 1874–1879, 2014.

CAYAN, H.; ERENER, G. Effect of olive leaf (*Olea europaea*) powder on laying hens performance, egg quality and egg yolk cholesterol levels. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 538–543, 2015.

CICERALE, S.; LUCAS, L.; KEAST, R. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 129–135, 2012. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911006811>>

CONDE, C.; DELROT, S.; GERÓS, H. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1545-1562, 2008.

COPPA, C. F. S. C. et al. Extração de oleuropeína a partir de folhas de oliveira utilizando solvente hidroalcoólico Extraction of oleuropein from olive leaves using a hydroalcoholic solvent. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], 2017.

CORTES, M. E. et al. The chlorhexidine: beta-cyclodextrin inclusion compound: Preparation, characterization and microbiological evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 297–302, 2001.

CRUZ, M. C. M. et al. Botânica, anatomia e ecofisiologia. In: OLIVEIRA, A. F. (Org.) **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. Cap. 5 p. 118-157.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 1033-1046, 2004.

DURÁN, R. M.; PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

EID, E. E. M. et al. Characterization of the inclusion complex of zerumbone with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 1707–1714, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.033>>

ERBAY, Z.; ICIER, F. The importance and potential uses of olive leaves. **Food Reviews International**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 319–334, 2010.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>>

FARES, R. et al. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. **Plant Foods Hum Nutr.** 2011 Mar;66(1):58-63.

FIELDING, L. Determination of Association Constant ( $K_a$ ) from Solution NMR Data. **Tetrahedron.** 56:6151-70, 2000.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 627–648, 1927.

FRACETO, L.F. et al. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:  $\beta$ -ciclodextrina. **Quim. Nova**, 30 (5), 1203-1207, 2007.

FRANCO, M. N. et al. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Virgin Olive Oil. **Food Chem.** 2014, 163, 289–298.

GHANBARI, R. et al. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, 13, 3291–3340, 2012.

GHOSH, A.; BISWAS, S.; GHOSH, T. Preparation and Evaluation of Silymarin  $\beta$ -cyclodextrin Molecular Inclusion Complexes. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 205–210, 2011. Disponível em: <<http://www.jyoungpharm.org/article/543>>

GOULAS, V. et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 600–608, 2009.

GOUVEIA, J. M. **Azeites Virgens do Alto Alentejo - Comportamento Químico, Tecnológico e Sensorial, Português**. 1995. Tese (Doutorado em Alimentos) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

GYAMFI, M. A.; YONAMINE, M.; ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 661–667, 1999.

HAN, J. et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 45–53, 2009.

HAYES, J. E. et al. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**. Vol. 126, p. 948–955, 2011.

HILL, S. E. A comparison of modern instruments for the analysis of the oxidation stability of fats, oils and foods. **Inform**, v. 1, p. 104-109, 1994.

HIRAYAMA, F. et al. Cyclodextrin conjugate based controlled release system: repeated and prolonged releases of ketoprofen after oral administration in rats. **Journal Control Release**. 2002; 82:407-16.

HIZAL, D. B. **Adsorption Of Olive Leaf Antioxidants On Silk Fibroin**. 2006. Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology, [s. l.], 2006.

HERRERO, M. et al. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1218, n. 42, p. 7511–7520, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311005632>>. Acesso em: 8 dez. 2017.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: IAL, 2008. 1020 p. Disponível em:<

[http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf)> Acesso em: 22/12/2017

JAPÓN-LUJÁN, R. et al. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.385, p. 753–759, 2006.

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**, [s. l.], v. 113, n. 4, p. 497–505, 2011.

JORGE, R. O. **Caracterização de azeites virgem extra “gourmet” varietais e “blends” comercialização no mercado do Rio Grande do Sul**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

KANAKIS, P. et al. From Olive Drupes to Olive Oil. An HPLC-Orbitrap-based Qualitative and Quantitative Exploration of Olive Key Metabolites. **Planta Med.** 2013, 79, 1576–1587.

KASHANI, H.H. et al. Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites, **Life Sci. J.** 9 (2012) 509–520.

KAUFMAN, P. B. et al. Natural products from plants. **Boca Raton**: CRC Press, FL, 1999.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J. L. Study of Factors Influencing Pressurised Solvent Extraction of Polar Steroids from Plant Material. Application to the Recovery of Withanolides. **Chromatographia**, v. 54, p. 394–398, 2001.

KHALIL, M. M. H.; ISMAIL, E. H.; EL-MAGDOUB, F. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. 1st Nano Updates. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 431–437, 2012.

KHODDAMI, A. et al. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

KIDMOSE, U. et al, Colour stability in vegetables. In: MACDOUGALL, D.B. (Ed.). **Colour in food: Improving quality**. Cambridge: Woodhead publishing, 2002. p.179-232.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. **The Journal of nutrition**, [s. l.], v. 139, n. 11, p. 2079–86, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776181>>

KOIDIS, A.; BOSKOU, D. The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** 108, 323–328, 2006.

LABUZA, T. P. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. **Food Technology**, [s. l.], v. 34, n. JANUARY 1980, p. 36–41, 1980.

LANDETE, J. M. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 52, p. 936–948, 2012.

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**, [s. l.], v. 354, n. 4, p. 872–878, 2007.

LEE, O.; LEE, B. Bioresource Technology Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 10, p. 3751–3754, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.052>>

LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chem** 2005; 91(1): 131-7.

LE FLOCH, F. et al. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. **Talanta**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1123–1130, 1998.

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

LIMA, J. R. De et al. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais Complex as a strategy for inclusion serving oils. **Rev. Bras. Farm.**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 397–402, 2012.

LOFTSSON, T. & MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.** 2001.

LOZANO-SÁNCHEZ, J.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A. Recovering Bioactive Compounds from Olive Oil Filter Cake by Advanced Extraction Techniques. [s. l.], p. 16270–16283, 2014.

LUCAS, A. De et al. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 221–228, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844601001322>>

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 2010;31(2):117-124.

MANNA, C. et al. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 461–466, 2004.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**, Ed. Eduem: Maringá, 2000.

MELO, M. M. R. de et al. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **Journal of Supercritical Fluids** 92 115–176, 2014.

MORAES, C. M. et al. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- -ciclodextrina. **Quím Nova**. 2007, 30:777-84.

MORENO, E.; REZA, J.; TREJO, A. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. **Polycyclic Aromatic Compounds**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 239–260, 2007.

MOSTAFA M.H. K.; EMAN H. I.; FATMA, M. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract: 1st Nano Updates. **Arabian Journal of Chemistry**. Vol 5, Issue 4, October 2012, pp. 431-437.

MOURA, P.M. et al. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **J. Supercrit. Fluids**. 62, 116–122, 2012.

MOURA, P. M. et al. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 62, p. 116–122, 2012. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844611004840>>

MOURTIZINOS, I., et al. Encapsulatrion of Olive Leaf Extract in Cyclodextrin. **Agriculture Food Chemistry**. Vol 55(20), p 8088-8094, 2007.

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**, [s. l.], v. 392, n. 5, p. 977–985, 2008.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>>

NIETO, A. et al. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 752–764, 2010.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2009, p. 70-83.

OMAR, S. H. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 111–121, 2010. a. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2010.05.005>>

OMAR, S. H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. **Scientia Pharmaceutica**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 133–154, 2010. b.

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

PAES, J. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 95, p. 8–16, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.025>>

PAVIA, D.L. et al. *Introdução à Espectroscopia*, Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, A. P. et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. **Molecules**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1153–1162, 2007.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 121–135, 2014.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Pressurized liquid extraction (PLE). In: **II campione per l'analisi chimica**. 1. ed. [s.l.] : Springer-Verlag Mailand, 2014. p. 177–214.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**. v.38, p.146-166, 2006.

RIBEIRO, A. Preparation and Solid-State Characterization of Inclusion Complexes Formed Between Miconazole and Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin. **AAPS Pharm Sci Tech**. 2008;9(4):1102-9.

RICHTER, B. E. et al. Accelerated Solvent Extraction : A Technique for Sample Preparation. [s. l.], v. 68, n. 6, p. 1033–1039, 1996.

RODRÍGUEZ-ROJO, S. et al. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 98–103, 2012.

ŞAHİN, 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 (Philadelphia)**, [s. l.], v. 47, n. 16, p. 2391–2398, 2012.

SAHIN, S.; SAMLI, R. Ultrasonics Sonochemistry Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 20, p. 595–602, 2013.

SALTA, F. N. et al. Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 6, p. 413-421, 2007.

SAMBASEVAM, K. P. et al. Synthesis and characterization of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and azomethine. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 3671–3682, 2013.

SHAHIDI, F. NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic; 1995.

SARKAR, S. K.; HOWARTH, R. E. Specificity of the Vanillin Test for Flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 317–320, 1976.

SONIWALA, M. M. et al. Various approaches in dissolution enhancement of Rofecoxib. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 67:61–3, 2005.

TAAMALLI, A. et al. Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 1817–1825, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.090>>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

TASIOULA-MARGARI, M.; OLOGERI, O. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC/MS. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 66, p. 530-534, 2001.

TERAMOTO, J.R.S; BERTONCINI, E.I.; PRELA-PANTANO. **Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil**. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_4/HistoricoOliveira/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/index.htm)>. Acesso em: 4/12/2017

TURNER, C.; WALDEBÄCK, M. **Separation extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries**, in: S. Rizvi (Ed.), in: Series in Food Science, Technology and Nutrition, vol. 202, Woodhead Publishing, Cambridge, 2010.

VILLA, F.; OLIVEIRA, A. F. Origem e expansão da oliveira na América Latina. In: OLIVEIRA, A. F. (Org.) **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção. Belo Horizonte: EPAMIG**, 2012. Cap. 5 p. 21-38.

VISIOLI, F. et al. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 104, n. 9–10, p. 677–684, 2002.

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

WINTERS, C. S.; YORK, P.; TIMMINS, P. Solid state examination of a gliclazide : beta-cyclodextrin complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 209–214, 1997.

XIE, P. J. et al. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 93, n. February, p. 29–38, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.10.004>>

XYNOS, N. et al. The Journal of Supercritical Fluids Development of a green extraction procedure with super / subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 67, p. 89–93, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.014>>

XYNOS, N. et al. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 122, p. 323–330, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.10.040>>

YALLAPU, M. M; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C.  $\beta$ -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Vol. 79, pp. 113-125, 2010.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], n. September 2000, 2001.

## **APÊNDICE**

**Tabela 1A:** Rendimentos mássicos de extrato de folhas de oliveira obtidos por etanol pressurizado em diferentes condições de extração.

Tempo (min)	30°C,	30°C,	30°C,	30°C,	45°C,	60°C,	60°C,	60°C,	60°C,
	100bar, 0.5 ml/min	100bar, 1.0 ml/min	200bar, 1.0 ml/min	200bar, 0.5 ml/min	150bar, 0.75 ml/min	100bar, 0.5 ml/min	100bar, 1.0 ml/min	200bar, 0.5 ml/min	200bar, 1.0 ml/min
1	0,073	0,560	0,326	0,122	0,245	0,205	0,681	0,274	0,595
2	0,160	0,847	0,560	0,215	0,459	0,420	1,032	0,502	0,908
4	0,357	1,359	1,152	0,435	0,867	0,928	1,713	1,022	1,579
8	0,795	2,208	2,013	0,874	1,702	1,657	2,910	1,865	2,804
12	1,224	3,063	2,788	1,327	2,236	2,460	3,952	2,696	3,867
16	1,653	3,687	3,412	1,869	2,862	3,208	4,785	3,328	4,785
20	2,067	4,219	3,921	2,141	3,457	3,906	5,458	4,056	5,466
25	2,559	4,728	4,441	2,646	4,078	4,740	6,139	4,870	6,155
30	3,016	5,117	4,784	3,083	4,592	5,495	6,690	5,703	6,725
35	3,436	5,447	5,058	3,475	5,020	6,183	7,153	6,377	7,195
40	3,825	5,726	5,263	3,865	5,467	6,779	7,570	7,006	7,604
50	4,502	6,128	5,537	4,142	6,017	7,825	8,305	8,131	8,290
60	5,070	6,453	5,751	4,422	6,412	8,681	8,881	8,943	8,816
90	6,143	7,102	6,223	4,874	7,229	10,510	10,305	10,629	10,135
120	6,759	7,509	6,583	5,791	7,780	11,679	11,395	11,651	11,227
150	7,125	7,990	6,889	6,261	8,224	12,554	12,322	12,459	12,054
180	7,379	8,446	7,158	6,560	8,633	13,308	13,083	13,136	12,769
210	7,563	8,817	7,404	6,815	8,981	13,943	13,733	13,748	13,431
240	7,744	9,193	7,538	7,015	9,313	14,526	14,332	14,261	13,994
270	7,905	9,689	7,740	7,187	9,648	15,064	14,848	14,711	14,531
300	8,031	10,155	7,853	7,352	9,885	15,565	15,351	15,148	15,060