



POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DE FOLHA DE OLIVEIRA DA REGIÃO DO PAMPA GAÚCHO FRENTE A DIFERENTES TÉCNICAS DE SECAGEM

THAMIRIS R. MARTINY^{1,2,*}, DOUGLAS HARDT³, LUÍSA B. ÁVILA⁴, VANESSA ROSSETO²,
CAROLINE C. MORAES³, GABRIELA S. DA ROSA^{2,3}

¹Prefeitura de Pinhais, Secretaria Municipal de Meio Ambiente

²Universidade Federal do Pampa, Curso de Engenharia Química

³Universidade Federal Pampa, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais

⁴Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

*e-mail: thamiris.martiny@hotmail.com

RESUMO – A secagem é uma operação empregada na preservação de produtos ou como etapa que antecede outras operações. Neste trabalho, objetivou-se estudar o impacto de diferentes técnicas de secagem e tipo de solvente extrator no potencial bioativo de extratos de folhas de oliveira (EFO). Os EFO foram avaliados em quatro condições: secagem convectiva e extração aquosa, secagem convectiva e extração etanólica, liofilização e extração aquosa, e liofilização e extração etanólica. Primeiramente, foram analisadas a atividade antioxidante (AA) e teor compostos fenólicos (CF). Na sequência, os EFO com melhores resultados seguiram para caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência e atividade antimicrobiana. Os resultados demonstraram que os EFO apresentaram alta AA e elevado CF. A aplicação de diferentes técnicas de secagem não impactou significativamente nesses resultados, já o solvente utilizado sim, sendo o etanol com melhor desempenho. Quanto à quantificação por cromatografia, o EFO apresentou uma gama de compostos, com mais proeminência, a oleuropeína. A análise da atividade antimicrobiana revelou o potencial bactericida dos extratos contra *Staphylococcus aureus*. O presente estudo mostrou que folhas de oliveira secas por liofilização ou secagem convectiva resultam em extratos com potencial bioativo, destacando a importância da escolha do método de secagem e solvente para futuros usos dos EFO pela indústria.

INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europea* L.) é uma árvore da família Oleaceae, que inclui espécies vegetais distribuídas em regiões tropicais e temperadas, mas também é uma espécie consolidada na região mediterrânea (Giacometti *et al.*, 2018; Putnik *et al.*, 2017). No entanto, o cultivo desta espécie vem se expandindo para outros territórios, incluindo o Brasil. Destacam-se as regiões Sul e Sudeste, as quais apresentam condições edafoclimáticas mais propícias para a olivicultura, com a produção de azeites premiados mundialmente. Isso demonstra a importância social e econômica desta cultura e a oportunidade emergente de usar qualquer um

de seus subprodutos olivicultura (Cavalheiro *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2019). Do ponto de vista econômico, o interesse pelas oliveiras está ligado à produção de azeitonas e azeite, mas durante esta produção são gerados subprodutos, os quais são igualmente valiosos, em frações líquidas e sólidas. As frações sólidas estão relacionadas às folhas e ao bagaço e a fração líquida é o efluente, que podem ser valorizadas pela composição de produtos inovadores, considerados uma rica fonte de produtos naturais como compostos fenólicos elevados. Além disso, a reutilização de subprodutos reduz a poluição causada por eles, além de tornar as plantas de lagares mais sustentáveis (Elkacmi *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2016).

Dentre esses subprodutos, destacam-se as folhas de oliveira, que são geradas durante o beneficiamento do fruto, na colheita e na poda, em grande quantidade, cerca de 25 kg de folhas e galhos, por árvore, provenientes das atividades de poda (Lamprou *et al.*, 2020). O processo em que as folhas são separadas das azeitonas por uma máquina sopradora, pode representar entre 4% e 10% em peso da azeitona que vai para o processamento. De acordo com o último relatório da Food Agriculture and Organization (FAO) que pesquisou o setor, 21,06 Mt de azeitonas são processadas todos os anos (Food Agriculture and Organization, 2020), levando à geração de 0,84 Mt de folhas de oliveira. Somente na Espanha, 0,2 milhão de toneladas de folhas de oliveira são geradas por ano (Lama-Muñoz *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2018; Sahin *et al.*, 2017). No Brasil, na safra 2018/2019, com área de produção de 1.500 hectares, foram colhidos 1.700.000 kg de azeitonas e produzidos 198.664 litros de azeite, o que representa uma quantidade substancial de folhas geradas como subproduto. A produção atual de azeites no Brasil ainda é pequena e típica de uma indústria nascente, porém, já possui grande destaque internacional e perspectivas de crescimento (International Oliviculture Council, 2020; Costa, 2019). Na região do pampa gaúcho espera-se chegar a uma produtividade de 10 toneladas de azeitonas por hectare, gerando 1,0 mil litros de azeite por hectare. Fazendo um comparativo dos solos do pampa gaúcho existe uma semelhança com os solos dos países da Europa. As pesquisas indicam que condições adequadas, aliadas ao uso da tecnologia, podem proporcionar uma excelente produção de azeitonas no Brasil, pois cada oliveira é capaz de produzir até 100 quilos por safra (Tejero e Rosa, 2020).

O aproveitamento da folha de oliveira é importante para a gestão dos resíduos, contribuindo assim para o ambiente. A folha tem potencial de conversão em produtos úteis de alto valor agregado, principalmente no que diz respeito aos benefícios à saúde humana devido à sua composição rica em compostos bioativos (Ahmad-Qasem *et al.*, 2016; Erbay & Icier, 2009). A investigação sobre a utilização das folhas de oliveira, nos mais

diversos setores industriais, é relevante. Algumas de suas aplicações incluem o desenvolvimento de medicamentos naturais, alimentos funcionais e conservantes naturais de alimentos (Ahmad-Qasem *et al.*, 2016; Martiny *et al.*, 2020), devido a presença de conteúdos fenólicos e atividade antioxidante em folhas de oliveira foram relatadas (Abaza *et al.*, 2011; El & Karakaya, 2009), mas muito poucos estudos estão disponíveis sobre métodos para preservá-los. E quando se trata da oliveira de origem geográfica brasileira, os estudos são limitados.

Estudos indicaram que a atividade biológica dos compostos presentes nas folhas de oliveira está associada ao tratamento de doenças, como febre, inflamação e hipertensão (Kermanshah *et al.*, 2020). Diante da atual situação de pandemia desencadeada pela doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), um estudo mostrou que a oleuropeína (composto fenólico) extraída da folha de oliveira pode atuar como agente antiviral (Coppa *et al.*, 2017; Omar, 2010; Sun & Ostrikov, 2020). As propriedades medicinais das folhas de oliveira são principalmente referidas como compostos fenólicos, que constituem um importante grupo de compostos antioxidantes, formado por um grande grupo de substâncias químicas. Os compostos fenólicos são considerados produtos secundários do metabolismo vegetal, geralmente derivados de reações de defesa contra agressões ambientais, com diferentes estruturas e atividades químicas (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). As folhas de oliveira possuem quantidades substanciais de compostos fenólicos como oleuropeína (o composto mais comum), verbascosídeo, luteolina-7-O-glucosídeo, hidroxitirosol, vanilina e rutina em sua composição, resultando em propriedades bioativas (Giacometti *et al.*, 2018; Kiritsakis *et al.*, 2017). Nesse sentido, é importante estudar técnicas que auxiliem na preservação desses compostos em folhas de oliveira os quais possibilitem sua aplicação, destacando-se a operação de secagem.

O processo de secagem de produtos vegetais que são utilizados pela indústria como matéria-prima é importante e deve ser aplicado após a colheita para melhor conservação, pois a redução do teor de umidade evita a ação de

agentes deteriorantes como enzimas e microrganismos (Geankoplis, 1998; Martinazzo *et al.*, 2010). Contudo, dependendo do tratamento térmico, a secagem dos produtos vegetais pode promover a redução indesejada de constituintes de interesse ou até mesmo alterações nas características do produto (Erbay e Icier, 2009). Nesse sentido, um dos desafios da indústria na secagem da folha de oliveira é o conhecimento das melhores técnicas de secagem para diminuir as perdas dos compostos bioativos. A secagem convectiva tem sido comumente usada para desidratação de produtos vegetais ao longo dos anos (Calín-Sánchez *et al.*, 2020), ao passo que a técnica de liofilização tem sido utilizada de maneira emergente.

A secagem por convecção utiliza ar quente como agente de transferência de calor e desidratação dos produtos. Algumas vantagens desta técnica são: método barato; promoção da higiene; uniformidade; simplicidade; conveniência; acessibilidade; e melhora do processo de secagem (Calín-Sánchez *et al.*, 2020; Senadeera *et al.*, 2020). Já a liofilização é baseada na desidratação por sublimação de um produto congelado, tendo como vantagem principal a maior preservação dos compostos (Ratti, 2001).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da secagem (convectiva em estufa e liofilização), bem como tipo de solvente extrator (água e etanol 40 %) na obtenção de extratos de folhas de oliveira originárias do Pampa Gaúcho ricos em compostos bioativos, e posteriormente, a caracterizar o extrato por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise microbiológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

As folhas de oliveira (*Olea europaea* L., Arbequina) (Figura 1) foram fornecidas pela fazenda Guarda Velha (-31.50042, -53.511200), produtora de azeite localizada em Pinheiro Machado no Pampa Gaúcho.

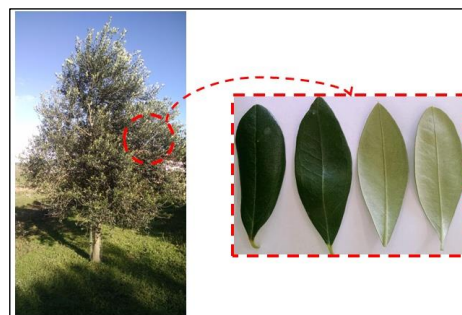


Figura 1: Folhas de oliveira (face adaxial (parte superior) e abaxial (parte inferior)).

Preparação da amostra e procedimento de extração

As folhas foram submetidas à higienização com solução de hipoclorito de sódio 2-2,5% (v/v) e lavadas em água corrente. Após esta etapa, elas foram divididas em duas partes, a primeira parte foi seca por convecção (Nova Ethics, 109-1) a 40 °C por 24 h (Thamiris R. Martiny *et al.*, 2020) e a segunda parte foi armazenada em sacos herméticos a -18 °C por 24 h e, em seguida, foram liofilizadas (Terroni - LS3000) por 48 h em alto vácuo ($\cong 0,3$ mmHg) a -50 °C (Avila *et al.*, 2020). As amostras foram moídas em moinho analítico (IKA, a11BS32) e depois enviadas para peneiramento. Nas etapas seguintes, foram utilizadas partículas com diâmetro inferior a 250 μ m (Thamiris R. Martiny *et al.*, 2020).

As folhas foram submetidas ao processo de extração de compostos bioativos pela técnica de maceração sólido-líquido, adaptada de Avila *et al.* (2020), utilizando banho metabólico Dubnoff (SOLABSL-157/30) a 88°C por 2 h. A extração foi realizada na proporção de 1:100 (biomassa moída: solvente), na qual foram utilizados dois solventes diferentes na extração, água destilada e solução etanólica a 40% (v/v) (da Rosa *et al.*, 2019). Após a extração, os extratos foram filtrados usando uma bomba de vácuo. Os extratos obtidos da biomassa liofilizada utilizando água destilada e etanol 40% como solvente extrator foram denominados LA e LE, respectivamente. CA e CE referem-se a extratos produzidos com biomassa seca por convecção, utilizando água e etanol 40%, respectivamente. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

Caracterização dos extratos

Atividade antioxidante: Em relação à atividade antioxidante (AA) dos extratos naturais, ainda não existe um método padronizado que forneça o valor da atividade antioxidante, mas alguns métodos são aceitos pela comunidade científica. As reações químicas que ocorrem em cada método são diferentes, sendo incorreto afirmar como “atividade antioxidante total” os resultados obtidos em diferentes técnicas, mas sim avaliar a reação química presente no método (Munteanu e Apetrei, 2021).

O potencial antioxidante dos extratos obtidos foi avaliado, utilizando-se o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) através da metodologia proposta por Brand-Williams et al., (1995) para determinar a capacidade de eliminação de radicais do DPPH (DPPH) e pela capacidade redutora férrica do plasma (FRAP) para determinar a capacidade de redução férrica (AAFRAP).

Para a determinação do AADPPH, foram utilizados 200 μ L do extrato natural para 7,8 mL do reagente DPPH e, em seguida, as amostras foram mantidas por 30 min em ambiente sem a presença de luz para que a reação ocorresse. A reação ocorre devido à redução dos radicais DPPH que são capturados pelos antioxidantes presentes nos extratos. Os resultados foram determinados usando um espectrofotômetro UV-visível (UV 755B, EQUILAM, Diadema, Brasil), no comprimento de onda de 517 nm. Além disso, para fins de controle, 200 μ L do extrato foram substituídos em uma amostra por 200 μ L de água destilada.

A metodologia FRAP consiste em preparar pelo menos três diluições do extrato a ser analisado. Em seguida, em ambiente sem a presença de luz, devem ser adicionados 270 μ L de água destilada, 90 μ L de cada diluição do extrato e 2,7 mL do reagente FRAP em tubos Falcon. As amostras foram então homogeneizadas e mantidas a 37 °C por 30 minutos para que a reação ocorresse. Após este período, as misturas foram analisadas em espectrofotômetro UV-Visível (595 nm). Nesta metodologia, uma curva padrão de sulfato ferroso é utilizada para quantificar a atividade antioxidante, e os resultados obtidos são expressos em μ M $\text{Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$ (Benzie e Strain, 1999).

Compostos fenólicos totais: Os compostos fenólicos totais (CF) foram determinados pela metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). O CFT foi determinado utilizando 0,5 mL de extrato, 10 mL de água destilada, 1 mL de reagente Folin Ciocalteu. Estes foram adicionados em um tubo de ensaio e, após 3 min, foram adicionados 8 mL de solução de Na_2CO_3 (7,5% p/v). Em seguida, as amostras foram colocadas em um ambiente sem a presença de luz por 2 h. Após esse período, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis (765 nm). Os compostos fenólicos totais foram calculados usando uma curva padrão de ácido gálico em diferentes concentrações e os resultados são expressos em $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ (b.s.).

Análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC: Para a análise por HPLC, os extratos foram filtrados através de um filtro de seringa de 0,45 mm e transferidos para vials. As análises de HPLC foram realizadas usando um Agilent 64 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) equipado com uma bomba quaternária (1200 Series) e detector de arranjo de diodos (DAD) (Agilent 1260 Series Photo Diode Array Detector). A separação foi conduzida a 30 °C usando uma coluna de LC de fase reversa Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). A coluna foi eluída a uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1} e o volume de injeção foi de 20 μ L. Foi utilizado um gradiente de eluição com 0,2% de ácido acético (Solvente A), metanol (Solvente B) e acetonitrila (Solvente C), A/B/C respectivamente. O gradiente para A/B/C começa com 96/2/2%, seguido por 80/10/10% nos próximos 5 min; 70/15/15% por 5 min; 50/25/25% por 10 min; e volta às condições iniciais com 96/2/2% por 10 min. A detecção de compostos fenólicos foi realizada em 280 nm e 520 nm para antocianinas. Os compostos fenólicos e antocianinas foram identificados por comparação de seus tempos de retenção de padrões puros Sigma-Aldrich® (Steineheim, Alemanha) e quantificados por meio de curvas de calibração.

Análise microbiológica: Os extratos naturais produzidos foram avaliados quanto à inibição e potencial bactericida contra *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus*

aureus (*S. aureus*). A metodologia utilizada foi a macrodiluição em caldo de acordo com o NCCLS. Todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (PRISMATEC-CS) a 120°C por 15 min. Para os extratos etanólicos, a evaporação rotativa foi realizada a 80 °C até que o processo fosse esgotado. Água destilada foi adicionada aos extratos para manter a solução inicial de 100 mL.

Para avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) a cultura bacteriana dos microrganismos estudados foi realizada em caldo nutriente (HIMEDIA) a 35 °C por 24 h em incubadora bacteriológica (SOLAB, SL 101). Após o tempo de incubação, a concentração do microrganismo foi ajustada pela escala McFarland 0,5, utilizando-se espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 625 nm. Em seguida, 0,5 mL de cultura do microrganismo foi adicionado a tubos de ensaio contendo 4,5 mL de extrato nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 90% (v/v). As diluições foram realizadas em caldo Müller-Hinton previamente esterilizado. Após o preparo, todas as amostras foram incubadas em incubadora bacteriológica a 35°C por 24 h.

Os resultados obtidos foram avaliados por análise visual, sendo a CMI a concentração na qual não foi observado crescimento visível de microrganismos.

Para verificar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) extratos, a amostra mais diluída que apresentou potencial inibitório e as 2 subsequentes foram cultivadas em placa de Petri contendo ágar. Em seguida, as amostras foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após esse período, verificou-se visualmente a presença de crescimento do microrganismo no ágar.

Análise estatística

Os dados experimentais foram expressos como valores médios \pm desvio médio. Diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ pelo *software Statistica* (StatSoft Inc., 10, Tulsa, OK, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 compila os resultados da atividade antioxidante e de composto fenólicos dos extratos obtidos.

Tabela 1: Resultados da atividade antioxidante e compostos fenólicos.

Extrato de folha de oliveira	LA	LE	CA	CE
AADPPH (%)	95,23 \pm 1,81 ^a	93,05 \pm 0,42 ^a	91,89 \pm 0,02 ^a	94,85 \pm 0,02 ^a
AAFRAP ($\mu\text{M Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$)	623,61 \pm 37,01 ^{ab}	484,14 \pm 17,97 ^{ab}	451,91 \pm 3,72 ^b	708,33 \pm 71,12 ^a
CF ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}^{-1}$)	41,64 \pm 0,65 ^c	56,45 \pm 0,91 ^b	46,31 \pm 1,04 ^c	67,90 \pm 1,42 ^a

O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi realizado entre amostras do mesmo extrato. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras.

Todos os extratos testados apresentaram excelentes resultados de atividade antioxidante pelo método AADPPH, variando de 91,89% a 95,23%, porém não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os diferentes tratamentos.

Ao analisar os resultados (Tabela 1), o uso do solvente etanol favoreceu a atividade antioxidante dos extratos, em que o uso de diferentes técnicas de secagem não impactou significativamente os resultados quando comparado apenas o uso de etanol. Para o extrato de folha de oliveira obtido por extração assistida por micro-ondas, Martiny *et al.*

(2021) e da Rosa *et al.*, (2019) obtiveram valores de 93,58% e 90,03%, respectivamente.

Os extratos também foram avaliados quanto à atividade antioxidante de acordo com a redução férrica em que foram avaliadas as diferentes condições de preparação. A Tabela 1 mostra os resultados, em que o melhor tratamento foi CE. Kashaninejad *et al.* (2020) estudaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos de folhas de oliveira da Espanha e Irã e encontraram concentrações: 1254,48 $\mu\text{M Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$ e 1075,27 $\mu\text{M Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente, evidenciando as diferenças encontradas nas regiões de coleta das folhas.

Os ensaios AADPPH e AAFRAP descreveram a capacidade das amostras testadas em neutralizar as espécies reativas e

modular o tom redox, e para que esse resultado seja melhor alcançado, o uso do etanol como solvente é mais indicado, pois para a atividade antioxidante o método de secagem não foi significativamente impactar este resultado em geral. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os encontrados na literatura que utilizaram a mesma espécie vegetal. A diferença entre os valores de AADPPH e AAFRAP relatados na literatura e os resultados obtidos neste trabalho podem estar relacionados a vários fatores, alguns deles: espécies de biomassa, qualidade do solo, tempo de armazenamento, condições de transporte após a colheita, condições de secagem da biomassa, método de limpeza da amostra, tamanho de partícula de biomassa, técnica de extração e solvente de extração (Martiny *et al.*, 2020). No entanto, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a técnica de extração por maceração apresentou valores competitivos para AADPPH e AAFRAP. Além disso, através dos resultados obtidos, é possível verificar que o uso de solventes ecologicamente corretos, como água e etanol, possibilitam a obtenção de um extrato com alto percentual de AADPPH e AAFRAP das biomassas estudadas.

Para os resultados de compostos fenólicos o maior valor foi obtido para a amostra CE. Martiny *et al.* (2020) obtiveram um valor de 41,40 mgGAE g⁻¹ para o extrato de folha de oliveira usando extração por maceração e água como solvente de extração.

Os resultados do presente trabalho foram competitivos com os relatados na literatura, demonstrando a relevância de se estudar outras técnicas e outros métodos de preparo de amostras para extração de compostos fenólicos.

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos totais estão de acordo com o que foi observado anteriormente para ambos os resultados de AADPPH e AAFRAP para atividade antioxidante. Este fato pode ser atribuído ao conteúdo fenólico presente nas amostras, que são conhecidos por sua atividade antioxidante (Barros *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2016). Além disso, o aumento entre os resultados obtidos no presente estudo e os resultados reportados na literatura pode estar

relacionado à espécie/localização das árvores de oliveira.

Com base nos resultados da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos (Tabela 1), as condições de extração mais favoráveis foram determinadas para cada uma das amostras, considerando o solvente e o método de secagem utilizado.

Devido às diferenças nas propriedades químicas dos compostos fenólicos em diferentes espécies de plantas, a escolha do solvente de extração ideal depende do tipo de amostra de planta. Portanto, a recuperação ideal de compostos fenólicos requer que o solvente seja selecionado com base na planta e no rendimento da extração de compostos fenólicos e, portanto, na atividade antioxidante. A extração de compostos antioxidantes geralmente ocorre por meio de solventes orgânicos, dentre os quais os mais comuns são o etanol e o metanol, em alguns casos a água também é adequada (Darvishzadeh, 2022). Na presente pesquisa, em todos os cenários, os extratos etanólicos apresentaram valores maiores ou nenhuma diferença significativa em relação aos extratos aquosos. Com base nos resultados sobre a eficiência do etanol na extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante, e devido à baixa toxicidade do etanol conforme recomendado pela Food and Drug Administration (FDA), foram selecionados extratos preparados com etanol.

Em relação ao método de secagem utilizado, a secagem convectiva foi melhor para os extratos etanólicos de folhas de oliveira. Assim, a amostra CE foi escolhida continuar a análise de HPLC e os estudos de atividade antimicrobiana. Esse resultado vai à contramão de outras pesquisas que indicam que a liofilização é uma das melhores opções pra secagem, uma vez que consegue manter as características de composição e qualidade melhores conservadas, porém é uma técnica mais cara (Hawlder *et al.*, 2006). Aqui, a secagem convectiva produziu extratos com características desejáveis superiores, sendo o custo neste caso mais baixo.

Análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC: Os compostos fenólicos individuais

que puderam ser identificados por HPLC foram listados na Tabela 2.

Tabela 2: Compostos fenólicos (mg.g⁻¹, b.s.) dos extratos naturais (média ± SE, n= 4).

Compostos Fenólicos	mg.g ⁻¹
Ácido gálico	ND
Ácido cafeico	0,08±0,00
Ácido p-cumárico	0,23±0,00
Ácido clorogênico	0,40±0,04
Ácido trans-cinâmico	0,10±0,00
Ácido trans-ferúlico	0,22±0,00
Kaempferol	0,52±0,01
Quercetina	0,75±0,02
Cianidina-3-glicosídeo	NI
Hidroxitirosol	3,71±0,54
Tirosol	1,11±0,23
Oleuropeína	130,45±6,07
Verbascosídeo	12,42±0,61

ND = abaixo do limite de detecção. NQ = abaixo do limite de quantificação. NI = não identificado.

Os principais compostos fenólicos presentes no extrato de folha de oliveira foram oleuropeína, verbascosídeo, hidroxitirosol e tirosol, o que era esperado e já foi relatado na literatura (Lozano-Sánchez *et al.*, 2013; Talhaoui *et al.*, 2014). Os níveis de oleuropeína nos extratos etanólicos (130,45 mg.g⁻¹) foram maiores quando comparados a outros estudos. Ghomari *et al.* (2019), avaliaram o extrato de folha de oliveira e obtiveram o valor de 80,67 mg.g⁻¹ de oleuropeína, utilizando extração por maceração em 2 etapas, utilizando primeiro etanol como solvente extrator e depois água. Essa diferença pode estar relacionada à temperatura de 25°C utilizada na extração. da Rosa *et al.* (2019), já relatavam que o aumento da temperatura favorece a extração de compostos fenólicos como a oleuropeína das folhas de oliveira. Lama-Muñoz *et al.*, (2019) avaliaram diferentes métodos de extração (Soxhlet e Extração Líquida Pressurizada) para diferentes cultivares obtendo níveis de oleuropeína de 43,4-122,3 mg.g⁻¹. A oleuropeína, o hidroxitirosol e o verbascosídeo possuem uma química ideal para a eliminação de radicais livres atuando como antioxidante, enquanto o tirosol possui atividade antioxidante fraca, mas é um composto muito estável, quando comparado a outros polifenóis,

menos sujeito à auto oxidação (Karkovi e Barbari, 2019; Talhaoui *et al.*, 2014).

Análise microbiológica: As condições de extração avaliadas promoveram uma boa recuperação dos principais compostos fenólicos para o extrato de folha de oliveira (oleuropeína). Esse composto fenólico possui grande potencial bactericida, promovendo essa característica ao extrato. A Tabela 3 mostra os resultados da inibição e a Figura 2 mostra o potencial bactericida dos extratos contra os microrganismos estudados.

Tabela 3: Potencial de inibição.

Conc. Ext. (%v/v)	20	40	60	80	90
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	NI	I	I	I
	NI	NI	I	I	I
	IU	IU	IU	IU	IU
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	NI	NI	I
	NI	NI	I	I	I
	NI	NI	I	I	I
	IU	IU	IU	IU	IU
	NI	NI	NI	NI	I

I = Inibição identificada. IU = inibição não identificada. NI = não ocorreu inibição.

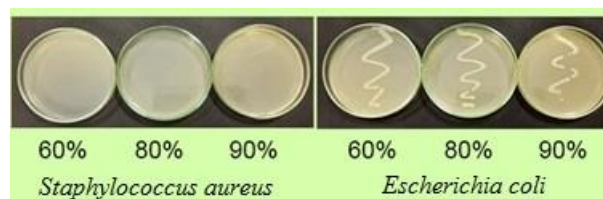


Figura 2: Potencial bactericida dos extratos naturais frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Através da análise de inibição (Tabela 3) foi possível obter a concentração inibitória mínima (CIM) para os extratos estudados. O extrato de folha de oliveira apresentou MIC na concentração de 60% (v/v) para ambos os microrganismos. Na Figura 2 é possível verificar o potencial bactericida do extrato de folha de oliveira. O extrato não apresentou potencial bactericida em nenhuma diluição para *Escherichia coli*. Segundo Gould (2009), esse fato pode ser atribuído ao perfil de microrganismos gram-negativos que são sabidamente mais resistentes que os gram-positivos, principalmente por possuírem uma camada protetora de polissacarídeos, o que dificulta a ação dos antimicrobianos. De maneira geral, o extrato apresentou resultados

promissores, demonstrando o alto potencial para serem aplicados em diferentes setores da indústria como agente bactericida.

Os polifenóis detectados nos extratos de folhas de oliveiras, podem ter a capacidade de penetrar na matriz fosfolipídica das células, devido à sua característica hidrofóbica. Assim, o principal mecanismo potencial envolvido em sua atividade antimicrobiana é a quelação de ferro, reduzindo a atividade de íons essenciais, inibindo a síntese da parede celular e, conseqüentemente, rompendo as membranas celulares (Farha *et al.*, 2020). Como as bactérias Gram-negativas apresentam uma barreira lipídica específica na parede celular, protegendo-as contra compostos hidrofóbicos, o efeito antimicrobiano da folha de oliveira em bactérias Gram-negativas é menor do que em Gram-positivas.

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos identificados e quantificados no presente estudo tem sido relatada na literatura. Hidroxitirosol, oleuropeína e verbascosídeo mostraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Bisignano *et al.*, 1999; Guillermo Avila *et al.*, 1999).

CONCLUSÕES

Folhas de oliveira foram secas utilizando liofilização e secagem convectiva, na sequência foram preparados extratos das folhas utilizando-se dois solventes diferentes (água e etanol). As diferentes técnicas de secagem não impactaram significativamente na atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos. Assim, a secagem convectiva foi escolhida para seguir com as demais caracterizações, haja vista ser menos dispendiosa. No entanto, os experimentos mostraram que o etanol foi a melhor opção de solvente extrator. Seu efeito na extração proporcionou um aumento significativo na atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais.

Adicionalmente, foram quantificados os compostos fenólicos mais importantes, sendo encontrado no extrato quantidade substancial de oleuropeína. Esses compostos fenólicos são possivelmente responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos, que apresentaram

importante efeito bactericida contra as bactérias *Staphylococcus aureus*. Em relação à importância da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos, mais estudos são necessários para corroborar os resultados através do uso de experimentos *in vivo*. Esses resultados mostraram-se potencialmente promissores na indústria alimentícia e nas indústrias farmacêutica e cosmética. Os extratos podem ser usados como aditivos naturais, para conservação de alimentos. Além disso, seu potencial bioativo pode ser explorado como atividade antioxidante e antimicrobiana, podendo substituir o uso de aditivos químicos sintéticos.

REFERÊNCIAS

- Abaza, L., Ben Youssef, N., Manai, H., Mahjoub Haddada, F., Methenni, K., & Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceites*, 62(1), 96–104. <https://doi.org/10.3989/gya.044710>
- Ahmad-Qasem, M. H., Ahmad-Qasem, B. H., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Cárcel, J. A., & García-Pérez, J. V. (2016). Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. *Industrial Crops and Products*, 79, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.006>
- Avila, L. B., Barreto, E. R. C., de Souza, P. K., Silva, B. D. Z., Martiny, T. R., Moraes, C. C., Morais, M. M., Raghavan, V., & da Rosa, G. S. (2020). Carrageenan-based films incorporated with jaboticaba peel extract: An innovative material for active food packaging. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules2523563>
- Barros, H. D. F. Q., Baseggio, A. M., Angolini, C. F. F., Pastore, G. M., Cazarin, C. B. B., & Marostica-Junior, M. R. (2019). Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jaboticaba peel (*Plinia cauliflora*). *Food Research International*, 124(2018), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01>

010

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299(1995), 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
- Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. Lo, Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974. <https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S023-6438(95)80008-5)
- Calín-Sánchez, A., Lipan, L., Cano-Lamadrid, M., Kharaghani, A., Masztalerz, K., Carbonell-Barrachina, Á. A. ., & Figiel, A. (2020). Comparison of Traditional and Novel Drying Techniques and Its Effect on Quality of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs. *Foods*, 9(1261). <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1788595>
- Cavalheiro, C. V., Picoloto, R. S., Cichoski, A. J., Wagner, R., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., Da Croce, D. M., & Barin, J. S. (2015). Olive leaves offer more than phenolic compounds - Fatty acids and mineral composition of varieties from Southern Brazil. *Industrial Crops and Products*, 71, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.054>
- Coppa, C. F. S. C., Rosim, R. E., De Oliveira, C. A. F., Da Costa Rodrigues, C. E., & Gonçalves, C. B. (2017). Extração de oleuropeína a partir de folhas de oliveira utilizando solvente hidroalcoólico. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.16916>
- da Rosa, G. S., Vanga, S. K., Garipey, Y., & Raghavan, V. (2019). Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 58, 102234. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102234>
- El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67(11), 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>
- Elkacmi, R., Boulmal, N., Kamil, N., & Bennajah, M. (2017). Techno-economical evaluation of a new technique for olive mill wastewater treatment. *Sustainable Production and Consumption*, 10, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2016.12.004>
- Erbay, Z., & Icier, F. (2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 91, 533–541.
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., Li, H. Bin, Zhu, F., Liu, H. Y., Gan, R. Y., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38(January), 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>
- Geankoplis, C. J. (1998). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias* (3rd ed.). CECSA.
- Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Drissi Kaitouni, L. B., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2019). Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnology Reports*, 23, e00347. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00347>
- Giacometti, J., Žauhar, G., & Žuvić, M. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of major phenolic compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.) using response surface methodology. *Foods*, 7(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods7090149>

- Gould, D. (2009). Effective strategies for prevention and control of Gram-negative infections. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)*, 23(48), 42–46.
<https://doi.org/10.7748/ns.23.48.42.s50>
- Guillermo Avila, J., De Liverant, J. G., Martínez, A., Martínez, G., Muñoz, J. L., Arciniegas, A., & Romo De Vivar, A. (1999). Mode of action of Buddleja cordata verbascoside against Staphylococcus aureus. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(1), 75–78.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00203-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00203-7)
- Hawladar, M. N. A., Perera, C. O., Tian, M., & Yeo, K. L. (2006). Drying of guava and papaya: Impact of different drying methods. *Drying Technology*, 24(1), 77–87.
<https://doi.org/10.1080/07373930500538725>
- Karkovi, A., & Barbari, M. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 24, 2001.
- Kashaninejad, M., Sanz, M. T., Blanco, B., Beltrán, S., & Niknam, S. M. (2020). Freeze dried extract from olive leaves: Valorisation, extraction kinetics and extract characterization. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 196–207.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.015>
- Kermanshah, Z., Samadanifard, H., Moghaddam, O. M., & Hejrati, A. (2020). Olive leaf and its various health-benefitting effects: a review study. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 14(2), 1301–1312.
- Kiritsakis, K., Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2017). Valorization of Olive Leaves : Spray Drying of Olive Leaf Extract. *Waste and Biomass Valorization*, 9(0), 616–633.
<https://doi.org/10.1007/s12649-017-0023-x>
- Lama-Muñoz, A., Del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2019). Optimization of oleuropein and luteolin-7-o-glucoside extraction from olive leaves by ultrasound-assisted technology. *Energies*, 12(13).
<https://doi.org/10.3390/en12132486>
- Lamprou, G. K., Vlysidis, A., Tzathas, K., & Vlyssides, A. G. (2020). Statistical optimization and kinetic analysis of the extraction of phenolic compounds from olive leaves. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(2), 457–465.
<https://doi.org/10.1002/jctb.6049>
- Lozano-Sánchez, J., Bendini, A., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Monitoring the bioactive compounds status of extra-virgin olive oil and storage by-products over the shelf life. *Food Control*, 30(2), 606–615.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.036>
- Martinazzo, A. P., Melo, E. C., Corrêa, P. C., & Santos, R. H. S. (2010). Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capim limão [Cymbopogon citratus (DC.) Stapf]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12, 488–498.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 50, 5–18.
- Martiny, Thamiris R., Pacheco, B. S., Pereira, C. M. P., Mansilla, A., Astorga-España, M. S., Dotto, G. L., Moraes, C. C., & Rosa, G. S. (2020). A novel biodegradable film based on κ-carrageenan activated with olive leaves extract. *Food Science and Nutrition*, 8(1), 3147–3156.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1554>
- Martiny, Thamiris Renata, Raghavan, V., De Moraes, C. C., Da Rosa, G. S., & Dotto, G. L. (2021). Optimization of green extraction for the recovery of bioactive compounds from Brazilian olive crops and evaluation of its potential as a natural preservative. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105130.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105130>
- Martiny, Thamiris Renata, Raghavan, V., Moraes, C. C. de, Rosa, G. S. da, &

- Dotto, G. L. (2020). Bio-Based Active Packaging: Carrageenan Film with Olive Leaf Extract for Lamb Meat Preservation. *Foods*, 9(12), 1759. <https://doi.org/10.3390/foods9121759>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nunes, M. A., Pimentel, F. B., Costa, A. S. G., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.016>
- Omar, S. H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78(2), 133–154. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>
- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-uzelac, V., & Kovačević, D. B. (2017). Green Extraction Approach for the Recovery of Polyphenols from Croatian Olive leaves (*Olea europea*). *Food and Bioproducts Processing*. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.004>
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311–319. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00228-4)
- Romero, C., Medina, E., Mateo, M. A., & Brenes, M. (2018). New by-products rich in bioactive substances from the olive oil mill processing. *J Sci Food Agric.*, 98(1), 225–230. <https://doi.org/10.1002/j>
- Rosa, G. S. da, Vanga, S. K., Garipey, Y., & Raghavan, V. (2019). Development of Biodegradable Films with Improved Antioxidant Properties Based on the Addition of Carrageenan Containing Olive Leaf Extract for Food Packaging Applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01589-7>
- Sahin, S., Samli, R., Birteks Z Tan, A. S., Barba, F. J., Chemat, F., Cravotto, G., & Lorenzo, J. M. (2017). Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/molecules22071056>
- Senadeera, W., Adiletta, G., Önal, B., Di Matteo, M., & Russo, P. (2020). Influence of different hot air drying temperatures on drying kinetics, shrinkage, and colour of persimmon slices. *Foods*, 9(1), 5–7. <https://doi.org/10.3390/foods9010101>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Sun, Z., & Ostrikov, K. (Ken). (2020). Future antiviral surfaces : Lessons from COVID-19 pandemic. *Sustainable Materials and Technologies*, 25, e00203. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2020.e00203>
- Talhaoui, N., Gómez-caravaca, A. M., León, L., De, R., Segura-carretero, A., & Fernández-gutiérrez, A. (2014). Determination of phenolic compounds of ‘ Sikitita ’ olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS . Comparison with its parents ‘ Arbequina ’ and ‘ Picual ’ olive leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.014>
- Tejero, I. P. T., & Rosa, A. L. T. da. (2020). Potencial Da Olivicultura No Sul Do Brasil. *Revista Científica AGROPAMPA*, 1(1), 114–123.
- Xu, Y., Burton, S., Kim, C., & Sismour, E. (2016). Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four virginia-grown grape varieties. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 125–133. <https://doi.org/10.1002/fsn3.264>