

Área: Engenharia de Alimentos

ATIVIDADE ANTIOXIDANTES DE EXTRATOS DE FOLHAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea*) OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUB E SUPERCRÍTICA

Andréia Dalla Rosa*; Rubia Mores; Nei Fronza; Angela Cristina Schneider; Wesley Fausto Costa Mendes; Rogério Luis Cansian; Geciane Toniazco Backes; Eunice Valduga; Elton Franceschi;

**Laboratório de Termodinâmica, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS-*

**Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC - *email- andreia.dallarosa@ifc-concordia.edu.br*

RESUMO – A oliveira tem se demonstrado uma alternativa como fonte alimentar através dos frutos fermentados como azeitonas ou na produção de azeite. Nos últimos anos com o avanço da ciência e a concentração de estudos para aprimoramento das tecnologias de produção e a o aproveitamento de sub produtos, tais como a folha de oliveira em função da disponibilidade de compostos bioativos. Neste contexto o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos de folha de oliveira obtidos por extração supercrítica com CO₂. A maior atividade antioxidante foi de 30,26 % com extrato obtido a 250bar e 60°C.

Palavras-chave: compostos fenólicos, 2,2-difenil-1-picril hidrazil - DPPH, CO₂

1 INTRODUÇÃO

No cultivo da oliveira (*Olea europaea*), a etapa de poda gera um volume considerável de biomassa (Bouaziz e Sayadi, 2005), as folhas e ramos da oliveira são resultado da poda e/ou da recolha do “fruto”, sendo considerados como subprodutos (BOLAÑOS et al., 2006; GONÇALVES, 2009). Anualmente geram um volume considerável de resíduos agroindustriais, fornecendo no ano cerca de 6 milhões de toneladas de biomassa somente na Espanha (Lapuerta et al, 2007), por exemplo, sendo a maioria dos quais são destruídos imediatamente para evitar pragas e eliminar dificuldades adicionais no manejo agrícola (RADA et al., 2007). Parte desta matéria orgânica é utilizada no confinamento de ovinos e caprinos. Outra aplicação para as folhas é a extração de compostos bioativos os quais podem ser utilizados como antioxidantes, sendo assim valoriza este subproduto.

Como todas as atividades agrícolas, esta atividade evolui constantemente, em relação aos avanços tecnológicos, novas estratégias de utilização desses subprodutos são desenvolvidas de acordo com as novas tendências de consumo (XYNOS et al, 2014; GONÇALVES, 2009; RADA et al, 2007; BOUAZIZ e SAYADI, 2005).

As folhas de oliveiras contém vários compostos fenólicos, tais como secoiridóides e flavonóides, que têm atividade antioxidante (BOUAZIZ e SAYADI, 2005; LANGUERRE et al., 2009; LEE, et al., 2009) e capacidade de sequestrar o H₂O₂ (Visioli, Petroni e Galli, 1994), sendo os compostos mais prevalentes representados pela forma dialdeídica do ácido decarboximetil elenólico ligado ao hidroxitirosol ou tirosol, isômeros das agliconas oleuropeina e ligstrosídeo (DI MAIO et al., 2013).

Abaza et al. (2011) e Gonçalves (2009) relatam os efeitos antimicrobianos, antioxidantes, antifúngicos, anti-inflamatórios e anti-viral dos extratos de folhas de oliveira. Estes benefícios são ocasionados pela biodisponibilidade de alguns compostos fenólicos e os seus derivados (ABAZA et al., 2011). Os compostos fenólicos encontrados na folha de oliveira constituem uma fração muito complexa (Gonçalves, 2009), com teor fenólico variando entre 1 e 14% (JAPÓN-LUJÁN et al., 2007).

Atualmente existem vários estudos sobre métodos de extração de polifenóis em diferentes matrizes (Sahin e Samli, 2013), sendo que a extração com fluído supercrítico apresenta a vantagem de ser uma tecnologia limpa, obtendo compostos de alto valor agregado com elevado grau de pureza, sem a necessidade de uma etapa adicional para a remoção de solventes (HERRERO et al., 2013). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos de folha de oliveira obtidos por extração com fluído sub e supercrítico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A extração com fluído sub e supercrítico (SFC) ocorreu em coluna de extração empacota com aproximadamente 22g de folhas de oliveira secas e trituradas (1 a 3 mm) da variedade *Negrinha do Freixó*, com pressurização estática prévia de 15min e em fluxo dinâmico de CO₂ de 2 mL/mim. As extrações foram realizadas de acordo com o planejamento fatorial, sendo que os níveis das variáveis independentes encontram-se na Tabela 01.

Tabela 01: Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2² para extrações com SFC.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
Pressão (bar)	80	165	250
Temperatura (°C)	20	40	60

Os extratos obtidos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5mg/mL sendo submetido a análises de atividade antioxidante na concentração de 0,5mg de extrato. A atividade antioxidante foi realizada pelo método 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH foi calculado segundo a equação 1.

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs. amostra - Abs. branco) \times 100]}{Abs. controle} \right\} \quad (1)$$

Sob as mesmas condições experimentais foi testado um padrão analítico de referência, o butil hidroxitolueno (BHT) na concentração de 1mg/mL e verificada a AA (%).

Os dados foram submetidos à avaliação estatística empregando-se a análise de variância (ANOVA) seguida das diferenças entre as médias pelo teste de Tukey, utilizando o Software Statistica versão 8.0 (StatSoft Inc®, USA) com nível de significância de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 02 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 com os valores codificados (reais) e a resposta da atividade antioxidante dos extratos obtidos por SFC. A maior AA foi de 30,26 % (0,5 mg/100 μ L) no extrato obtido na condição de 250 bar e 60°C. O BHT apresentou AA de 76,43 % (0,1 mg/100 μ L), atividade superior quando comparado com a maior AA do extrato obtido na condição de 250 bar e 60°C.

Tabela 02: Atividade antioxidante dos extratos (0,5 mg/100 μ L) obtidos por SFC em diferentes pressões e temperaturas.

Ensaio	Variáveis Independentes		Resposta
	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	AA (%)
1	-1 (80)	-1(20)	23,63 \pm 0,036
2	1(250)	-1(20)	28,93 \pm 0,003
3	-1(80)	1(60)	0*
4	1(250)	1(60)	30,26 \pm 0,126
5	0(165)	0(40)	20,98 \pm 0,002
6	0(165)	0(40)	19,94 \pm 0,002
7	0(165)	0(40)	19,08 \pm 0,002
8	BHT	0,1 mg/100 μ L	76,43 \pm 0,854

*Não foi obtido extrato neste experimento.

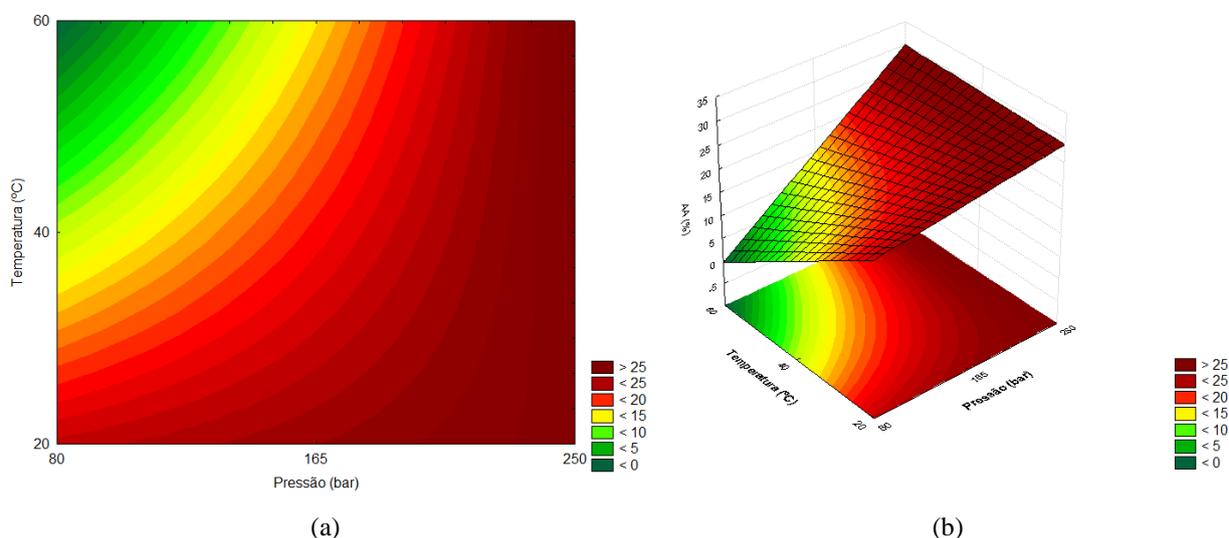
Os resultados foram tratados estatisticamente e a Equação 2 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve a AA (%) em função das variáveis analisadas (pressão e temperatura), dentro das faixas estudadas. Observa-se que as variáveis apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$), sendo que a pressão apresentou efeito significativo positivo e a temperatura efeito significativo negativo, no entanto a interação entre as duas variáveis apresentou efeito positivo. O modelo foi validado pela análise de variância, onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,99 e $F_{calculado}$ de 2,98 vezes maior que $F_{tabelado}$, os quais permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 1.

$$AA (\%) = 20,40 + 8,89.(Press\tilde{a}o) - 5,58.(Temperatura) + 6,24.(Temperatura).(Press\tilde{a}o) \quad (2)$$

A utilização de CO₂ em temperaturas elevadas viabiliza a extração de componentes cerosos, apolares, lipofilicos como ácidos graxos, terpenos, triglicerideos, hidrocarbonetos e álcoois que não contribuem muito para a AA (HE et al., 2012; REVERCHON e DE MARCO, 2006; TABERA et al., 2004; XYNOS et al., 2012).

A presença de compostos da família dos tocoferois como a vitamina E  uma das moléculas de maior importância com atividade antioxidante presentes na folha de oliveiras e facilmente extraidas por SFC em baixas temperaturas, justificando a AA estatisticamente igual nos tratamentos a 250bar e 20 e 60C (DE MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014; DAUKSAS et al., 2002; LUCAS et al., 2002).

Figura 01: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) demonstrando o efeito da pressão e temperatura sobre AA(%).



As ilustrações da Figura 1 possibilitam visualizar com maior clareza as condições de processo e a influência dos fatores relacionados a ele, neste caso indicando que condições mais brandas propiciam maior AA. As curvas de contorno e superfície de resposta indicam maior AA em toda faixa de pressão para a temperatura de 20C e em 60C e maiores pressões. Segundo Lucas et al, (2002) verificaram em seu estudo que não houve aumento no teor de tocoferois com o aumento da temperatura em extrações com SFC-CO₂ em folhas de oliveira, explicando a AA significativamente igual nos extratos obtidos em ambas temperaturas (20 e 60C).

Importante ressaltar que o extrato bruto, sem purificação ou concentração foi utilizado no presente estudo para análise de AA, justificando a menor atividade dos extratos em estudo quando comparado com o padrão BHT, demonstrando potencial como agente antioxidante natural.

4 CONCLUSÃO

Os extratos que apresentaram maiores AA foram obtidos nas condições de 250bar e 60C e 250bar e 20C com as respectivas AA de 30,26 e 28,93%.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq, FAPERGS, URI e o IFC pela concessão de bolsas e/ou apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- ABAZA, L. et al. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. **Grasas y aceites**, n. 62, p. 96-104, 2011.
- BOLAÑOS, J. et al. Extraction of interesting organic compounds from olive Oil waste. **Grasas y Aceites**. n. 57, 95–106, 2006.
- BOUAZIZ, M. e SAYADI, S. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 497–504, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., e BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **The Analyst**, v. 126, n.7, p. 1182–1193, 2001.
- DAUKSAS, E., et al. Supercritical Fluid Extraction of Tocopherol Concentrates from Olive Tree Leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, n.3, p. 221-228, 2002.
- DE MELO, M. M. R., et al. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115–176, 2014.
- DI MAIO, I., et al. Characterization of 3,4-DHPEA-EDA oxidation products in virgin olive oil by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1381–1391, 2013.
- GONÇALVES, R. A. C. Incorporação de folha de oliveira na dieta de suínos em crescimento. Efeito nas performances, digestibilidade, parâmetros sanguíneos e características da carne. Vila Real, 2009. Disponível em: <https://repositorio.utad.pt/bitstream/10348/413/1/msc_racgon%C3%A7alves.pdf>. Acesso em 10 de abr. 2013.
- HE, L. et al. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC e ABTS assay. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 215e 223.2012.
- HERRERO, M., et al. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67-83, 2013.
- JAPÓN-LUJÁN, R. et al. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 76-82, 2007.

- LAGUERRE, M., et al. Characterization of olive-leaf phenolics by esi-ms and evaluation of their antioxidant capacities by the cat assay. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 1215–1225. 2009.
- LAPUERTA, M., HERNÁNDEZ, J. J., & RODRÍGUEZ, J. Comparison between the kinetics of devolatilisation of forestry and agricultural wastes from the middle-south regions of Spain. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n.1, p. 13–19, 2007.
- LEE, O. H., et al. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6107–6113, 2009.
- LUCAS, A. D. et al. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, n. 3, p 221–228. 2002.
- RADA, M., et al. Solid/liquid extraction and isolation by molecular distillation of hydroxytyrosol from *Olea europaea* L. leaves. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 1071–1076, 2007.
- SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; e MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p 444–452, 2012.
- STAMATOPOULOS, K.; KATSOYANNOS, E.; CHATZILAZAROU, A. Antioxidant Activity and Thermal Stability of Oleuropein and Related Phenolic Compounds of Olive Leaf Extract after Separation and Concentration by Salting-Out-Assisted Cloud Point Extraction. **Antioxidants**, 4, 3, 229-244, 2014.
- REVERCHON, E. e DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–166, 2006.
- TABERA, J., et al. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4774–4779, 2004.
- VISIOLI, F.; PETRONI, A.; GALLI, C. Phenolic compounds extracted from olive oil prevent oxidation of low density lipoproteins and inhibit platelet function and platelet and leukocytes eicosanoid production in vitro. In: Paoletti R, Samuelsson B, Catapano AL, Poli A, Rinetti M, editors. **Oxidative processes and antioxidants**. New York: Raven Press, p. 199-206, 1994.
- 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**, v.122, p. 323–330, 2014.
- XYNOS, N. et al. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 89–93, 2012.