

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
ASSISTIDA POR ULTRASSOM E DETERMINAÇÃO  
DE ÁCIDOS GRAXOS E MINERAIS EM FOLHAS DE  
*Olea europaea* L.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Caroline Viegas Cavalheiro**

**Santa Maria, RS, Brasil, 2013**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ASSISTIDA POR  
ULTRASSOM E DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E  
MINERAIS EM FOLHAS DE *Olea europaea* L.**

**Caroline Viegas Cavalheiro**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Qualidade dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Orientador: Prof. Juliano Smanioto Barin**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ASSISTIDA POR  
ULTRASSOM E DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E  
MINERAIS EM FOLHAS DE *Olea europaea* L**

elaborada por  
**Caroline Viegas Cavalheiro**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Juliano Smanioto Barin, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Alexandre José Cichoski, Dr. (UFSM)**  
(Co-orientador)

**Erico Marlon de Moraes Flores, PhD. (UFSM)**  
(Examinador)

**Sandro Rogério Giacomelli, Dr. (URI)**  
(Examinador)

**Santa Maria, 28 de fevereiro de 2013**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais,  
Dilmar e Ignez, a minha irmã,  
Carine, e aos meus queridos colegas Matheus Rafael Raschen (*in memoriam*) e  
Carolina Corte Real (*in memoriam*)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida e por ter me dado forças, principalmente nesta última fase do trabalho.

Aos meus pais e minha irmã, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, incentivando-me a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Juliano Barin, por todos os ensinamentos que foram me passados ao longo desses dois anos, pela paciência e confiança depositada em meu trabalho.

Ao Professor Roger Wagner, pelas orientações, explicações, sempre com a maior boa vontade, dando-me grande suporte para a realização de todas as análises.

Aos meus colegas de trabalho Vandrisa Rosso, Bruna Tischer, Jonas Simon Dugatto, Jossiê Donadel, Gabrieli Bernardi, Daniele Ferreira, Raquel Vendruscolo, Mariane Bittencourt e Tassiane Ferrão por toda a ajuda e amizade dedicada nesses dois anos. Em especial quero agradecer aos nossos dois anjinhos Matheus Raschen e Carolina Simões Côrte Real que agora, como estrelas, brilham lá no céu. Obrigada meus queridos amigos por terem dado a mim o privilégio de ter convivido com pessoas tão maravilhosas que vocês eram. A imagem de vocês alegres e sempre dedicados, correndo pelo laboratório com uma ânsia por aprender e sempre demonstrando amor por aquilo que faziam ficará gravada para sempre em minha memória. Saudade imensa.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, por todo o conhecimento passado, e em especial ao professor Alexandre Cichoski, que foi quem me apresentou às folhas de oliveira.

Ao Prof. Érico M. M. Flores pela disposição dos equipamentos utilizados nas análises e também a toda a sua equipe, em especial a Rochele Picoloto e ao Cláudio Herbst, que colaboraram para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao Prof. Sandro Rogério Giacomelli por ter aceitado fazer parte da banca analisadora do trabalho, juntamente com o Prof. Érico M. M. Flores, Roger Wagner e Alexandre Cichoski.

Aos funcionários da EPAGRI e da EMATER, que me cederam e ajudaram na coleta das folhas de oliveira, e aos colegas Eloi Paulus e Cristiane Marangoni, que também colaboraram na coleta das amostras.

Ao programa REUNI pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

## RESUMO

### EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ASSISTIDA POR ULTRASSOM E DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E MINERAIS EM FOLHAS DE *Olea europaea* L.

As folhas de oliveira são um subproduto agrícola gerado pela poda de oliveiras. Recentemente, foi relatado que essas folhas apresentam elevados teores de compostos fenólicos com atividade biológica, o que despertou o interesse tanto acadêmico quanto econômico com relação ao aproveitamento das mesmas para a alimentação animal e humana. Contudo, há pouca informação sobre a presença de outros compostos de interesse nutricional, tais como ácidos graxos e elementos minerais. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar o perfil de ácidos graxos e elementos presentes em diferentes variedades de folhas de oliveira cultivadas no sul do Brasil, assim como desenvolver um procedimento de extração de compostos fenólicos com auxílio do ultrassom, utilizando um solvente de baixa toxicidade (etanol 60% v/v, adicionado de ácido cítrico 1 g L<sup>-1</sup>), e compará-lo com a extração por metodologia tradicional de extração (maceração), visando sua futura aplicação em produtos alimentícios. Para as variedades estudadas, Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki e Grappolo as concentrações de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos totais variaram de 4,37% a 6,00%; 10,50% a 13,10%, 9,13% a 9,80% e 8,74% a 32,63%, respectivamente. A variedade Arbosana apresentou a maior concentração de compostos fenólicos totais quando se realizou uma extração seguida de re-extração por maceração (35,71 mg GAE g<sup>-1</sup>), e a maior concentração de ácidos graxos saturados (total de 37,26%, sendo 1,54 ± 0,04% ácido mirístico; 26,90 ± 0,50% ácido palmítico; 5,55 ± 0,14% ácido esteárico e 3,26 ± 0,13% ácido araquídico). As variedades Ascolano, Koroneiki e Grappolo apresentaram as maiores quantidades dos ácidos graxos considerados benéficos à saúde (68,03%; 68,63% e 68,18% respectivamente, dados relativos ao somatório dos ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico). A variedade Ascolano apresentou de modo geral as maiores concentrações da maioria dos minerais determinados. Os elementos presentes em maior concentração nas cinco variedades estudadas foram Al, Ca, Fe, K, Mg, P e S, mas os teores encontrados para Fe, Cu, Zn Mn e Ca foram mais significativos com relação à ingestão diária recomendada. Estes resultados demonstram a importância da constituição destas variedades que podem ser utilizadas como suplementos na alimentação animal ou humana. Na extração dos compostos fenólicos assistida por ultrassom utilizando a variedade Arbequina foram otimizados a posição da sonda (1 e 3 cm), a temperatura de extração (20 °C, 40 °C e 60 °C) e o tempo de extração (0,5 - 20 min) utilizando 40% de amplitude e 20 kHz. Os resultados indicaram que a utilização de 20 °C, durante 20 min de extração levaram a uma recuperação de 75,33% dos compostos fenólicos (20,50 ± 0,26 mg GAE g<sup>-1</sup>), quando comparado com o método convencional de extração (maceração, 22 °C, 5 h, 27,32 ± 0,90 mg GAE g<sup>-1</sup>). A posição da sonda não interferiu significativamente nos resultados e o principal efeito provocado pelo ultrassom foi agitação. Assim, desenvolveu-se um método rápido e eficaz de extração, confirmando os benefícios da utilização de ultrassom na obtenção de extratos a partir de fontes naturais.

**Palavras-chave:** Folhas de oliveira. Ácidos graxos. Minerais. Compostos fenólicos. Ultrassom.

## ABSTRACT

### ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND DETERMINATION OF FATTY ACID AND MINERALS IN *Olea europaea* L. LEAVES

Olive leaves are an agricultural by-product generated by the pruning of trees. Recently, it was reported that these leaves have high levels of phenolic compounds with biological activity, which increase the interest of both academic and economic exploitation in relation to their use for feed and food. However, few information is available regarding to the presence of other nutritional compounds, such as fatty acids and mineral elements. Thus, this study aimed to determine the fatty acids profile and also different elements present in different varieties of olive leaves grown in southern Brazil, as well as develop a procedure for extraction of phenolic compounds with the aid of ultrasound, using a low-toxicity solvent (ethanol 60 % v/v, with 1 g L<sup>-1</sup> citric acid), and compare it with the traditional extraction method of extraction (maceration) to its future application in food products. For varieties studied, Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki and Grappolo concentrations of ash, protein, lipid and total carbohydrates levels ranged from 4.37% to 6.00%, 10.50% to 13.10%, 9.13% to 9.80% and 8.74% to 32.63%, respectively. The variety Arbosana showed the highest concentration of phenolic compounds when was carried out one extraction followed by re-extraction by maceration (35.71 mg GAE g<sup>-1</sup>), and the highest concentration of saturated fatty acids (total of 37.26%, composed by 1.54 ± 0.04% myristic acid, 26.90 ± 0.50% palmitic acid, 5.55 ± 0.14% stearic acid and 3.26 ± 0.13% arachidic acid). The varieties Ascolano, Koroneiki and Grappolo had the highest amounts of fatty acids considered beneficial to health (68.03%, 68.63% and 68.18% respectively, data for the sum of fatty acids oleic, linoleic and linolenic). The Ascolano variety showed generally higher concentrations of most minerals determined. The elements present in highest concentration in the five varieties studied were Al, Ca, Fe, K, Mg, P and S, but the levels found for Fe, Cu, Zn, Mn, and Ca were more significant in relation to the recommended daily intake. All these results show the importance of the formation of these varieties which can be used as supplements in the feed. In the extraction of phenolics from Arbequina variety assisted by ultrasound were optimized the position of the probe (1 and 3 cm), the extraction temperature (20 °C, 40 °C and 60 °C) and the extraction time (0.5 - 20 min), using 40% amplitude and 20 kHz frequency. The results showed that the use of 20 °C during 20 min for extraction lead to 75.33% of recovery of phenolic compound (20.50 ± 0.26 mg GAE g<sup>-1</sup>) when compared with the conventional method of extraction (maceration, 22 °C, 5 h, 27.32 ± 0.90 mg GAE g<sup>-1</sup>). The position of the probe did not significantly affect the results and the main effect caused by the ultrasound was stirring. Thus, we developed a fast and effective method of extraction, confirming the benefits of using ultrasound to obtain extracts from natural sources.

**Keywords:** Olive leaves. Fatty acids. Minerals. Phenolic compounds. Ultrasound.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### MANUSCRITO 1

- Figure 1. Graph of scores (samples, A) and weights (variables, B) of the first and third principal components of PCA regarding to chemical composition of olive leaves samples. .... 50
- Figure 2. Graph of scores (samples, A) and weights (variables, B) of the second and third principal components of PCA regarding to chemical composition of olive leaves samples. .... 51
- Figure 3. Amount of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids content (%) in olive leaves studied. .... 52

### MANUSCRITO 2

- Fig. 1. Influence of probe position on the extraction of total phenolic compounds from olive leaves (n=3). .... 77
- Fig. 2. Effect of time and temperature on extraction of total phenolic compounds from olive leaves (n=3). .... 78
- Fig. 3. Effect of sonication on the extraction of phenolic compounds from olive leaves (n=3). .... 79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extração dos compostos fenólicos totais e oleuropeína de folhas de oliveira utilizando procedimentos convencionais de extração (maceração).....	23
Tabela 2. Extração de compostos fenólicos e de outras substâncias presentes em folhas de oliveira utilizando procedimentos não convencionais de extração.....	26

### MANUSCRITO 1

Table 1. Chemical composition of different varieties of olive leaves. Values (%) are reported as of dry mass, n=3.....	46
Table 2. Main fatty acids present in varieties of olive leaves evaluated. ....	47
Table 3. Elements determined in the olive leaves varieties studied. Values are reported as $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry mass.....	48
Table 4. Element content in 50 g of each variety of olive leaves and its relation with recommended daily intake. ....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** - Análise de variância, do inglês *analysis of variance*
- AOAC** – do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*
- BHT**- Butilhidroxitolueno
- CAE** - Equivalente de ácido caféico, do inglês *caffeic acid equivalent*
- FAMES** – ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*
- FID** – detector de ionização em chama, do inglês *flame ionization detector*
- GAE** – Equivalente de ácido gálico, do inglês *gallic acid equivalent*
- GC**- Cromatografia a gás, do inglês *Gas Chromatography*
- GRAS** - solvente geralmente considerado seguro, do inglês *general recognize as safe*
- HE** - Equivalente de hidroxitirosol
- ICP-OES** – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
- MAE** – Extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave assisted extraction*
- PCA** - Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Components Analysis*
- pH** - Potencial hidrogeniônico
- PLE** – Extração com líquido pressurizado, do inglês *pressurized liquid extraction*
- PUFAs** – Ácidos graxos poli-insaturados, do inglês *polyunsaturated fatty acids*
- SFE** – Extração com fluido supercrítico, do inglês *supercritical fluid extraction*
- SHLE** - Extração com líquido superaquecido, do inglês *superheated liquid extraction*
- TAE** - Equivalente de ácido tânico, do inglês *tanic acid equivalent*
- TROLOX** - padrão 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2- ácido carboxílico
- UAE** – Extração assistida por ultrassom, do inglês *ultrasound assisted extraction*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1	<i>Olea europaea</i> L. ....	16
2.2	Determinação de ácidos graxos em folhas de oliveira.....	18
2.3	Determinação de elementos minerais em folhas de oliveira.....	19
2.4	Extração de compostos fenólicos empregando procedimentos convencionais .....	21
2.5	Extração de compostos fenólicos empregando procedimentos não convencionais...	24
2.6	Procedimentos de extração assistidos por ultrassom .....	29
3	MANUSCRITOS.....	32
3.1	Manuscrito 1 .....	32
	Abstract.....	33
1	Introduction .....	34
2	Materials and methods.....	36
2.1	<i>Chemical and standards</i> .....	36
2.2	<i>Plant material and sampling</i> .....	37
2.3	<i>Procedure for chemical composition evaluation</i> .....	37
2.4	<i>Determination of total phenolic content</i> .....	38
2.5	<i>Determination of fatty acids</i> .....	39
2.6	<i>Determination of mineral content</i> .....	39
2.7	<i>Statistical analysis</i> .....	40
3	Results and discussion .....	40
4	Conclusions .....	45
5	Acknowledgements .....	45
6	Appendices .....	46
7	References .....	53
3.2	Manuscrito 2 .....	60
	Abstract.....	61
1	Introduction .....	62
2	Material and Methods .....	64
2.1	<i>Chemical and standards</i> .....	64
2.2	<i>Plant material and sampling</i> .....	64
2.3	<i>Conventional extraction method</i> .....	65
2.4	<i>Ultrasound-assisted extraction</i> .....	65
2.5	<i>Determination of total phenolic content</i> .....	66
2.6	<i>Statistical analysis</i> .....	66
3	Results and Discussion .....	67
3.1	<i>Extraction using conventional method</i> .....	67
3.2	<i>Ultrasound-assisted extraction</i> .....	67
4	Conclusion .....	70
5	Acknowledgements.....	70
6	References.....	71
7	Appendices.....	77

4 DISCUSSÃO .....	80
5 CONCLUSÕES .....	82
REFERÊNCIAS.....	83

# 1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore frutífera classificada na família botânica *Oleaceae*, característica da região Mediterrânea, utilizada para fins ornamentais, produção de azeitonas de mesa e também para a produção do azeite de oliva (FARES et al., 2011; LALAS et al., 2011). Seu cultivo se estende por regiões de climas temperados e tropicais, principalmente nos países da costa do mar mediterrâneo, onde se encontram aproximadamente 90% dos 10 milhões de hectares cultivados em todo o mundo (COUTINHO et al., 2009a).

No Brasil, o cultivo das oliveiras teve início por volta de 1800 em diversas regiões do país, apresentando olivais bastante produtivos nos arredores de São Paulo. Esses olivais acabaram sendo extintos durante o período colonial por ordem real, para evitar que os produtos brasileiros viessem a competir com os portugueses (VILLA, OLIVEIRA, 2012). Hoje existem aproximadamente 1,2 mil hectares de área cultivada com as oliveiras no Brasil (EMBRAPA, 2012), distribuídas principalmente nas regiões Sul e Sudeste que apresentam microclimas favoráveis ao crescimento dessa cultivar (VILLA, OLIVEIRA, 2012). Entretanto, o país ainda é dependente das importações de azeitonas e de azeite de oliva, visto que o Brasil não apresenta produção comercial dos referidos produtos, o que reforça a importância do desenvolvimento da olivicultura (OLIVEIRA; ANTUNES; SCHUCH, 2006).

A importância que o cultivo da oliveira representa para a economia pode ser observada pela análise do consumo e do volume importado de seus produtos. Dados referentes aos anos de 2009 e 2010 revelam um consumo mundial de azeite de oliva e de azeitonas equivalentes a 2.902.000 e 2.199.000 ton, respectivamente (CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL, 2012). O Brasil é responsável por grande parte desse consumo, ocupando a quarta e a quinta posição entre os maiores importadores mundiais de azeitonas e de azeite de oliva, respectivamente (COUTINHO et al., 2009a). Esses dados ressaltam a importância econômica e social que os produtos da oliveira fornecem tanto para os países produtores, quanto para os importadores desses alimentos.

Além dos frutos e do azeite, as oliveiras produzem uma quantidade significativa de resíduo agrícola através da poda das árvores (TROMBESI et al., 2012; XYNOS et al., 2012). A finalidade principal da poda consiste em renovar ou restaurar parte ou totalidade da planta,

dando formato adequado, e ocorre com frequência variada dependendo das necessidades do pomar (COUTINHO et al., 2009b). Esse procedimento produz uma quantidade equivalente a 10% do peso total de azeitonas colhidas para a produção do azeite de oliva (DELGADO et al., 1998), o que também corresponde a cerca de 25 kg de folhas e ramos gerados por árvore anualmente (MYLONAKI et al., 2008). Esses dados demonstram a necessidade de um melhor aproveitamento dessa importante matéria-prima, visto que as folhas estão disponíveis a um baixo custo, são de fácil obtenção (LI et al.; 2011) e, assim como os frutos e o azeite, apresentam um alto teor de compostos fenólicos (ERBAY e ICIER, 2010; SAHIN, SAMLI, 2013).

Os compostos fenólicos são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e se caracterizam por apresentarem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxílicos, incluindo seus derivados funcionais (ÂNGELO; JORGE, 2007). Essas substâncias apresentam elevada capacidade de sequestrar radicais livres, agindo como potentes antioxidantes (XYNOS et al., 2012). Os radicais livres são formados diariamente pelo corpo humano, e são sequestrados por enzimas, como a catalase e a superóxido dismutase, que agem como antioxidantes endógenos (DIMITRIOS, 2006). Quando essas enzimas estão em baixas concentrações, os radicais livres reagem com moléculas de DNA, proteínas e lipídios, ocasionando danos que estão associados ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas (DIMITRIOS, 2006). Isso explica o estudo disseminado de produtos naturais, que objetivam extrair os compostos com atividade antioxidante, adicionando-os na dieta da população (DIMITRIOS, 2006).

Tendo em vista a necessidade de aproveitamento das folhas de oliveira, torna-se importante estudar métodos adequados de extração de compostos fenólicos que permitam efetuar o processo de maneira rápida, com bom rendimento e que evite a degradação dos compostos ativos. As técnicas tradicionais de extração sólido-líquido, como maceração, percolação e Soxhlet, utilizam calor e agitação com a finalidade de aumentar a eficiência da extração, através da transferência de massa para o solvente extrator (ASPÉ e FERNÁNDEZ, 2011; ÁVILA, CAPOTE, CASTRO, 2007). Esses métodos geralmente empregam grande quantidade de solventes, tempo e energia, contribuindo para a geração de resíduos e poluição do meio ambiente (ÁVILA, CAPOTE, CASTRO, 2007). Por isso, várias alternativas têm sido estudadas para tentar minimizar esses problemas, utilizando métodos de extração mais rápidos e que utilizem solventes menos tóxicos ao ambiente e em menores quantidades (MUSTAFA e

TURNER, 2011; RAMOS, 2012; RICÁRDEZ et al., 2011). A extração assistida por ultrassom pode ser considerada um método não convencional que vem demonstrando eficiência na extração de compostos bioativos. Vantagens como menor consumo de reagentes e tempos de extração são frequentemente observadas em comparação aos métodos tradicionais (CHEMAT et al.; 2011; VILKHU et al.; 2008).

Além dos compostos fenólicos, existem outras substâncias de interesse presentes nas folhas, tais como elementos minerais, proteínas, carboidratos, e lipídios, mas poucos estudos são encontrados na literatura, sendo que nenhum relata a composição química das oliveiras cultivadas no Brasil. Considerando que existem poucos estudos sobre as folhas de oliveira cultivadas no Brasil, neste trabalho é proposta a avaliação da composição química (análise centesimal, ácidos graxos, elementos minerais e compostos fenólicos) de cinco variedades de folhas de oliveira cultivadas na região Sul. Além disso, é proposto um método de extração de compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira assistido por ultrassom, utilizando um solvente de baixa toxicidade e tempo de extração reduzido.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Olea europaea* L.

A oliveira é classificada como uma árvore de porte médio, que apresenta troncos contorcidos e robustos, folhas persistentes, com aspecto lanceolado, e frutos pequenos, com formatos que variam de elipsoidal a globosos (CRUZ et al., 2012). Algumas oliveiras costumam viver durante centenas de anos, sendo a alta longevidade uma de suas características (DÍEZ et al.; 2011). Isso se deve principalmente ao fato da oliveira ser muito resistente a alterações de temperatura, adaptando-se bem em regiões de verões quentes e secos e invernos frios e úmidos (EPAMIG, 2002; VILLA, OLIVEIRA, 2012).

Em todo o mundo existem mais de 200 variedades de oliveiras, sendo que, muitas vezes, variedades idênticas possuem nomes distintos dependendo da região em que são cultivadas (CABALLERO, 2012). No Brasil, as variedades que predominam são a Arbequina, com 50% do plantio, Grappolo, com 20%, Maria da Fé com 10%, e outras variedades ocupando 20% do plantio (p. ex., Arbosana, Koroneiki e Ascolano) (VILLA, OLIVEIRA, 2012). As variedades Koroneiki, Arbequina, Arbosana e Grappolo são destinadas à produção de azeite de oliva devido ao alto rendimento de óleo produzido pelos frutos (EMBRAPA, 2013; EPAMIG, 2002; OLISUL, 2013). A variedade Koroneiki é característica da Grécia, resistente à seca, mas suscetível ao frio (BARRANCO, FERNANDEZ-ESCOBAR, RALLO, 2008; OLISUL, 2013). A variedade Arbequina é característica da Espanha, muito resistente ao frio e tolerante à salinidade (BARRANCO, FERNANDEZ-ESCOBAR, RALLO, 2008; EMBRAPA, 2013). A variedade Arbosana apresenta características agrônômicas similares a cultivar Arbequina, com elevada produtividade de azeite (EMBRAPA, 2013). As variedades Ascolano e Negrinha do Freixó diferenciam-se das demais variedades apresentadas neste estudo por serem destinadas à produção de azeitonas de mesa, pois produzem quantidade reduzida de óleo (EMBRAPA, 2013; CONFAGRI, 2013), sendo a variedade Ascolano característica da Itália, tolerante ao frio, porém exigente a solos alcalinos e bem drenados (BARRANCO, FERNANDEZ-ESCOBAR, RALLO, 2008; EMBRAPA, 2013).

As diferentes variedades de oliveira produzem frutos com características peculiares, com distintos tamanhos, sabores e composição. Algumas cultivares produzem frutos destinados à produção do azeite de oliva, que é obtido através da compressão direta da azeitona. Esse processo possibilita a transferência dos compostos presentes nas azeitonas praticamente intactos para a fração oleosa, resultando assim em um produto rico em ácidos graxos monoinsaturados, vitaminas e compostos fenólicos, além de manter o sabor e odor característicos do fruto (RIACHY et al., 2011). Além disso, o azeite de oliva proporciona efeitos benéficos à saúde, reduzindo os riscos do aparecimento de doenças cardiovasculares, câncer e certos tipos de doenças crônicas (ERBAY; ICIER, 2009; MIRANDA et al., 2010; PEREZ-JIMENEZ et al., 2005). A capacidade das oliveiras em sintetizar substâncias farmacologicamente ativas, encontradas tanto nos frutos quanto no azeite e folhas, tem sido explorada há muito tempo. Na antiguidade, já se conhecia a capacidade das folhas de oliveira em curar infecções bacterianas, viróticas e fúngicas, quando eram utilizadas na forma de chás (EL e KARAKAYA, 2009). Também se utilizava as folhas como emplastos para auxiliar a cicatrização de ferimentos (PACETTA, 2012). Atualmente, tem sido relatado na literatura que os extratos das folhas de oliveira apresentam ação antioxidante, hipotensiva, hipoglicemiante, hipouracêmica, entre outras (BENAVENTE-GARCIA et al., 2000). Essas atividades estão relacionadas principalmente com o elevado teor de compostos fenólicos presentes nas folhas (KIRITSAKIS et al., 2010).

Nas folhas de oliveira, os compostos fenólicos majoritários são a oleuropeína e o seu derivado, o hidroxitiroso (ERBAY, ICIER, 2010). Também são encontradas, em menores concentrações, outras substâncias, como tiroso, ácido cafeico, ácido *p*-cumarínico, ácido vanílico, vanilina, luteolina, rutina, verbascosídeo, luteolina-7-glucosídeo, apigenina-7-glucosídeo e diosmetina-7-glucosídeo (TASIOULA-MARGARI, OLOGERI, 2001). Essas substâncias apresentam elevada capacidade de sequestrar radicais livres, agindo como potentes antioxidantes, que poderiam ser utilizados em alimentos para prevenir a oxidação (principalmente de lipídios), aumentando a vida-útil dos produtos alimentícios (XYNOS et al., 2012). Alguns pesquisadores já utilizaram os compostos fenólicos presentes nas folhas com esse objetivo, aplicando-os no azeite de oliva e enriquecendo ainda mais esse produto (JAPÓN-LUJÁN, CASTRO, 2008; ACHAT et al., 2012). Além da utilização em produtos alimentícios, as folhas de oliveira têm sido consideradas uma matéria-prima com potencial utilização na alimentação de animais (MOLINA-ALCAIDE, YANEZ-RUIZ, 2008),

colaborando também para a melhora na qualidade da carne, como foi demonstrado por Botsoglou et al. (2010) e Martins et al. (2009), que relataram que o uso de folhas de oliveira na alimentação animal provocou a redução da oxidação lipídica da carne.

Além dos compostos fenólicos, existem outras substâncias de interesse presentes nas folhas de oliveira. Tsiplakou e Zervas (2008) estudaram a composição química das folhas de oliveira cultivadas na Grécia, de variedade não especificada, encontrando os mesmos ácidos graxos presentes no azeite de oliva, tais como os ácidos palmítico, oleico, linoleico, palmitoleico, esteárico, linolênico e araquídico. A presença desses ácidos graxos ressalta a importância da caracterização das folhas de oliveira, sendo necessários maiores estudos para identificar o verdadeiro valor nutricional das mesmas. A concentração de Mn, Fe, Zn, Ca, Mg, K e P presentes nas folhas de oliveira da variedade Koroneiki, cultivadas na Grécia, foi analisada por Chatzistathis et al. (2010), que demonstraram não haver influência do tipo de solo na variação da concentração desses nutrientes. Fernández-Escobar, Moreno e Garcia-Creus (1999) estudaram o conteúdo mineral presente nas folhas de oliveira da variedade Picual, cultivadas na Espanha, e observaram uma variação na concentração de elementos minerais em folhas jovens e folhas maduras. As folhas jovens possuíam um maior teor de N, P, K, Zn e B, enquanto que as folhas maduras apresentaram maior concentração de Ca, Mg, Mn, Cu e Fe. Cabe ressaltar que, apesar do crescente interesse nas folhas de oliveira, nenhum estudo a respeito da caracterização das folhas de oliveira cultivadas no Brasil foi encontrado na literatura, o que ressalta a importância desse trabalho.

## **2.2 Determinação de ácidos graxos em folhas de oliveira**

A determinação da composição de ácidos graxos presentes em uma amostra sólida envolve, primeiramente, a extração da fração lipídica. Diferentes metodologias são propostas com esse objetivo. Os métodos oficiais de extração descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) requerem de 4 a 14 h de extração, dependendo do tipo de amostra analisada (METHEREL et al., 2009). A técnica mais amplamente utilizada consiste na extração empregando sistema do tipo Soxhlet.

A extração empregando sistemas do tipo Soxhlet consiste no aquecimento e evaporação do solvente extrator depositado em um balão de destilação, que condensa e entra em contato com a amostra depositada no tubo extrator. A amostra normalmente fica envolvida em um cartucho de papel filtro que evita que a mesma seja direcionada ao balão de destilação. Assim, somente o solvente e as substâncias extraídas são transferidos para o balão de destilação, onde o processo recomeça até o esgotamento do analito (CASTRO, CAPOTE, 2010). Essa metodologia tem a vantagem de fornecer sempre solvente puro e ser uma metodologia simples, que requer pouco treinamento. Além disso, o equipamento básico pode ser obtido com custo relativamente baixo (CASTRO, CAPOTE, 2010). Como desvantagem essa metodologia utiliza elevado volume de solvente extrator e emprega elevadas temperaturas que podem ocasionar a degradação de substâncias termolábeis (CASTRO, CAPOTE, 2010).

Uma alternativa para evitar a degradação dos ácidos graxos consiste em utilizar técnicas de extração a frio, como a metodologia descrita por Bhig e Dyer (1959). Nessa técnica, os lipídios são extraídos utilizando clorofórmio como solvente extrator, em um curto intervalo de tempo (menos de uma hora) empregando menor volume de solvente. É considerada mais eficaz que a extração por Soxhlet devido à menor polaridade do solvente empregado (clorofórmio) em relação aos solventes normalmente utilizados na extração por Soxhlet (p. ex., éter de petróleo, hexano). Após a extração, o solvente é evaporado e os lipídios extraídos são submetidos ao processo de metilação (HARTMAN, LAGO, 1973). Esse processo consiste na transesterificação dos acilgliceróis e a esterificação dos ácidos graxos livres em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*) (MILINSKI et al.; 2008). Posteriormente os FAMEs são separados e determinados por cromatografia gasosa (GC), empregando detector de ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*) ou analisador de massas.

### **2.3 Determinação de elementos minerais em folhas de oliveira**

A determinação de elementos presentes em folhas é importante tanto na área agrícola quanto na promoção da saúde humana, pois permite detectar deficiências nutricionais ou

excessos que podem comprometer o crescimento e desenvolvimento da planta (FERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2010), além de verificar o valor nutricional dos alimentos (SAHAN, BASOGLU, GUCER, 2007).

Várias técnicas analíticas podem ser empregadas para a determinação de elementos minerais em amostras de folhas, tais como a espectrometria de absorção atômica, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (SAHAN, BASOGLU, GUCER, 2007) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (BIZZI et al., 2011). A ICP-OES é uma técnica multielementar que pode ser empregada para determinação de vários elementos em diferentes tipos de amostra (SOUZA, COTRIM, PIRES, 2013). A técnica consiste na emissão de radiação eletromagnética por átomos ou íons em elevadas temperaturas (superiores a 6000 K) atingidas em um plasma, geralmente de argônio.

Contudo, previamente à determinação dos elementos, é necessária uma etapa prévia de preparo das amostras, que permite a conversão das amostras sólidas em soluções aquosas. (SOUZA, COTRIM, PIRES, 2013). Nessa etapa, a decomposição da matéria orgânica é efetuada para evitar interferências na etapa de determinação (MESTER, STURGEON, 2003). Em geral, a decomposição da amostra é efetuada empregando ácido nítrico como oxidante em sistemas abertos ou fechados. Devido ao menor risco de perdas ou contaminação durante o processo de digestão, os sistemas fechados têm sido mais utilizados. Atualmente, a digestão assistida por micro-ondas tem sido muito empregada com o objetivo de acelerar o processo de oxidação da matéria orgânica e tem sido considerada como o estado da arte para digestão de amostras orgânicas (MESTER, STURGEON, 2003). Recentemente, foi demonstrado que a utilização de uma atmosfera pressurizada com oxigênio proporciona a utilização de ácidos diluídos para digestão de amostras botânicas (BIZZI et al., 2010, BIZZI et al., 2011). O emprego de ácido nítrico diluído também tem sido recomendado nas digestões, pois permite minimizar a geração de resíduos laboratoriais que antes eram formados com o uso de ácidos concentrados (BIZZI et al., 2011) e evita possíveis interferências causadas pela excessiva acidez dos digeridos.

## **2.4 Extração de compostos fenólicos empregando procedimentos convencionais**

A extração dos compostos com propriedades farmacológicas é uma das etapas mais críticas nas pesquisas com produtos naturais (XYNOS et al., 2012), pois sua eficiência depende de vários parâmetros, como o tipo de amostra, tipo de analitos a serem extraídos, localização em que esses analitos se encontram na amostra (MUSTAFA, TURNER, 2011), tipo de solvente extrator, (XYNOS et al., 2012), método de extração e temperatura de extração (GALANAKIS et al., 2010), entre outros.

Para amostras sólidas, uma das primeiras etapas a serem realizadas é a transferência dos analitos em estudo para a fase líquida, composta pelo solvente extrator adequado (CASTRO, CAPOTE, 2010). Esse processo, também chamado de extração sólido-líquido ou lixiviação, é uma das metodologias mais antigas empregadas no preparo de amostras (CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998; MILIC et al., 2013). A maceração é um exemplo de extração sólido-líquido muito utilizada para obtenção de compostos fenólicos de fontes vegetais. Esse procedimento emprega calor e/ou agitação, para acelerar a dissolução dos analitos no meio extrator. Contudo, apesar da simplicidade e baixo custo, uma baixa eficiência é frequentemente observada, uma vez que o processo de extração é moroso, variando de horas a dias para ser efetuado (CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998; CASTRO, CAPOTE, 2010).

Diversos trabalhos têm sido propostos utilizando metodologias convencionais de extração, não havendo uma técnica de referência de extração dos compostos presentes nas folhas de oliveira. Na Tabela 1 estão listados alguns trabalhos realizados com folhas de oliveira, nos quais foram apresentadas as melhores condições de extração dos compostos fenólicos, com seus respectivos rendimentos.

É importante observar que o menor tempo utilizado para a extração dos compostos fenólicos com as metodologias tradicionais foi de 3 h (LEE et al., 2009). Contudo até 24 h de extração têm sido utilizadas (KIRITSAKIS et al., 2010; ABAZA et al., 2011; ANSARI et al., 2011; RAFIEE et al., 2011). Os solventes que apresentaram melhor eficiência nas extrações dos compostos fenólicos foram misturas hidroalcoólicas contendo metanol e etanol, sendo esse último empregado em concentrações que variaram de 50 a 80% (v/v). O etanol tem sido

preferido ao metanol por ser considerado um solvente geralmente seguro (GRAS, do inglês *General Recognize as Safe*), apresentando baixa toxicidade (RODRIGUES-ROJO et al., 2012). As temperaturas empregadas variam desde a temperatura ambiente (20 °C) até 80 °C, sendo que os rendimentos obtidos com as extrações dependem também da proporção entre a amostra e solvente em que cada experimento foi realizado. Uma maior quantidade de compostos fenólicos foi obtida no método proposto por Mylonaki et al. (2008), que efetuaram a otimização do processo de extração dos compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira da variedade Koroneiki, cultivadas na Grécia. As melhores condições encontradas foram empregando etanol 60% (v/v) e pH 2, com uma proporção de amostra/solvente igual a 1:40 e 5 h de extração. A quantidade de compostos fenólicos obtida com a extração foi de  $253,0 \pm 76,8$  mg GAE g<sup>-1</sup> de massa seca. Tendo em vista que o solvente extrator utilizado foi um solvente de baixa toxicidade e que uma otimização dos parâmetros de extração foi efetuada, esta metodologia de extração convencional dos compostos fenólicos foi escolhida como referência para a realização deste trabalho.

Tabela 1 Extração dos compostos fenólicos totais e oleuropeína de folhas de oliveira utilizando procedimentos convencionais de extração (maceração).

<b>Solvente</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Quantidade de amostra/ volume total de solvente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Referências</b>
Metanol (60%, v/v)	24	Ambiente	10 g; 200 mL	5,58 a 6,20 mg GAE kg <sup>-1</sup>	KIRITSAKIS et al. (2010)
Metanol (80%, v/v)	-	-	2,5 g; 10 mL (3 extrações)	11,70 a 40,10 g TAE kg <sup>-1</sup>	SILVA et al. (2006)
Metanol (80%, v/v)	24	Ambiente	1 g; 10 mL	24,09 mg GAE g <sup>-1</sup>	ABAZA et al. (2011)
Metanol	-	Ambiente	5 g; 100 mL	351,34 mg HE 100 g <sup>-1</sup>	BRAHMI et al. (2012)
Etanol (50%, v/v)	24	Ambiente	1 g; 50 mL	69,03 mg TAE g <sup>-1</sup>	RAFIEE et al. (2011)
Etanol (60%, v/v)	5	Ambiente (22 ± 2 C)	0,5 g; 20 mL	253,0 ± 76,80 mg GAE g <sup>-1</sup>	MYLONAKI et al. (2008)
Etanol (80%, v/v)	3	80	250 mg; 2500 mL (3 extrações)	148 mg TAE g <sup>-1</sup>	LEE et al. (2009)
Água deionizada	4	60	50 g; 400 ml	13 mg oleuropeína g <sup>-1</sup>	ANSARI et al. (2011)

TAE- equivalente de ácido tânico; GAE- equivalente de ácido gálico; HE- equivalente de hidroxitirosol.



## **2.5 Extração de compostos fenólicos empregando procedimentos não convencionais**

O desenvolvimento de procedimentos de extração que possibilitem a utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente e que sejam usados em menor quantidade tem sido proposto como uma alternativa para o desenvolvimento da chamada “química verde” (HERRERO et al., 2010; RODRÍGUEZ-ROJO et al., 2012). Para tanto, os procedimentos convencionais vem sendo substituídos ou modificados de acordo com o surgimento de procedimentos alternativos, tais como a extração assistida por micro-ondas (MAE) (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006b), extração com fluido supercrítico (SFE), extração com fluido pressurizado (PLE) (HERRERO et al., 2010; XYNOS et al., 2012) e extração assistida por ultrassom (US) (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006a).

A SFE e PLE são consideradas tecnologias “verdes” de extração, pois normalmente empregam solventes como CO<sub>2</sub>, etanol e água, classificados como “GRAS”. As metodologias que empregam a PLE e a MAE são capazes de diminuir os tempos de extração devido às altas temperaturas, que diminuem a tensão superficial e a viscosidade do solvente, o que acelera a solubilização dos analitos nessa fase. Conseqüentemente tem-se um aumento da eficiência da extração (TAAMALLI et al., 2012). Já a tecnologia que emprega a SFE tem como vantagens a alta seletividade por analitos apolares, a automação do processo e a redução do volume de resíduos orgânicos gerados. Além disso, a técnica permite que mudanças operacionais sejam realizadas durante as extrações, facilitando a recuperação de compostos específicos (XYNOS et al., 2012). A técnica empregando US tem a vantagem de diminuir os tempos de extração dos analitos principalmente devido aos efeitos físicos e químicos provocados pelo fenômeno de cavitação, que acelera as reações (SORIA, VILLAMIEL, 2010).

Na Tabela 2 é mostrada uma descrição de alguns parâmetros observados para os procedimentos de extração não convencionais utilizados aplicados às folhas de oliveira, com as condições otimizadas pelos respectivos autores. Nela pode-se observar que o menor tempo de extração utilizado foi de 6 min e o maior foi de 180 min. Quando se compara os tempos das extrações entre os procedimentos convencionais (Tabela 1) e não convencionais (Tabela 2), pode-se perceber que o tempo de extração de compostos fenólicos de folhas de oliveira é reduzido quando os procedimentos alternativos são utilizados.

A maioria dos procedimentos propostos na Tabela 2 emprega misturas hidroalcoólicas de metanol e etanol, variando entre 50% a 80% (v/v) para etanol. As temperaturas utilizadas ficaram na faixa entre 25 °C a 150 °C, obtendo diferentes rendimentos de extração, dependendo, também, da proporção entre amostra/solvente. Quando se analisam os rendimentos obtidos com diferentes metodologias de extração de compostos fenólicos de folhas de oliveira descritas por Taamalli et al. (2012) se percebe que a maior concentração nos extratos foi obtida com o uso da PLE, utilizando etanol como solvente extrator, a 150 °C, durante 20 min.

Tabela 2 Extração de compostos fenólicos e de outras substâncias presentes em folhas de oliveira utilizando procedimentos não convencionais de extração.

Procedimento	Solvente	Tempo de extração] (min)	Temperatura de extração (°C)	Quantidade de amostra/volume total de solvente	Rendimento da extração	Referências
SFE	CO <sub>2</sub> (modificado com 10% de metanol)	140	100	30 mg; 2 mL min <sup>-1</sup>	16,80 ± 0,80 mg CAE g <sup>-1</sup>	FOCH et al. (1998)
US- banho	Metanol	120	40	1 g; 100 mL	144 g GAE kg <sup>-1</sup> do extrato	SKERGET et al. (2005)
AHLE	Etanol (70% v/v)	13	140	1 g	(Oleuropeína) 23,05 ± 902 g kg <sup>-1</sup>	JAPÓN-LUJÁN, CASTRO (2006)
US- Sonda (20 kHz, 450 W, Amplitude de 30%)	Etanol (59% v/v)	25	40	1 g; 5 mL min <sup>-1</sup>	(Oleuropeína) 22,61 ± 0.63 g kg <sup>-1</sup>	JAPÓN-LUJÁN et al. (2006a)
MAE	Etanol (80% v/v)	8	-	1g; 8 mL	(Oleuropeína) 2,32 ± 0.85%	JAPÓN-LUJÁN et al. (2006b)
US- sonda (20 kHz, 450 W, 50% de amplitude)	Etanol	20	45	1 g; 30 mL	(Compostos triterpênicos) 83 a 103%	ÁVILA, CAPOTE, CASTRO (2007)

Tabela 2. Extração dos compostos fenólicos e de outras substâncias presentes nas folhas de oliveira utilizando metodologias não convencionais de extração (continuação).

Procedimento	Solvente	Tempo de extração (min)	Temperatura de extração (°C)	Quantidade de amostra/volume total de solvente	Rendimento da extração	Referências
US- banho (30 kHz; 600 W)	Etanol (80% v/v)	180	60	20 g; 440 mL	(Atividade antioxidante) 16146 ± 1116 µmol TROLOX L <sup>-1</sup>	CÁRCEL et al. (2010)
MAE	Etanol (50% v/v/)	15	-	1g; 50 mL	88,30 mg TAE g <sup>-1</sup>	RAFIEE et al. (2011)
SFE	CO <sub>2</sub> (modificado com metanol)	-	100	-	(Oleuropeína) 14,26 mg g <sup>-1</sup>	SAHIN et al. (2011)
MAE	Metanol (80% v/v)	6	80	1,25g; 10 mL	15,20 a 16,70% (Compostos fenólicos totais)	TAAMALLI et al. (2012)
SFE	CO <sub>2</sub> + 6,6% etanol	60	40	1 g	5,80 a 9,70% (Compostos fenólicos totais)	TAAMALLI et al. (2012)
PLE	Água	20	150	1 g	7,50 a 11,20% (Compostos fenólicos totais)	TAAMALLI et al. (2012)
PLE	Etanol	20	150	1 g	14,80 a 22,40% (Compostos fenólicos totais)	TAAMALLI et al. (2012)
SFE e PLE	CO <sub>2</sub> (modificado com 5% de etanol); água	-	50	6 g	44,10% (Compostos fenólicos totais)	XYNOS et al. (2012)
US- banho	Etanol (50% v/v)	60	25	0,5 g; 10 mL	25,06 mg GAE g <sup>-1</sup>	SAHIN, SAMLI (2013)

MAE- Extração assistida por micro-ondas, SFE- Extração com fluido supercrítico, PLE- Extração com líquido pressurizado, SHLE- Extração com líquido superaquecido, US- Extração assistida por ultrassom, CAE- equivalente de ácido caféico; GAE- equivalente de ácido gálico; TAE- equivalente de ácido tânico; TROLOX (padrão 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-ácido) carboxílico

## 2.6 Procedimentos de extração assistidos por ultrassom

O ultrassom é uma onda mecânica que se diferencia do som audível pelos seres humanos por apresentar frequências maiores que 20 kHz (CASTRO et al., 2011; CHEMAT et al., 2011) e propaga-se em meios sólidos, líquidos e gasosos (CASTRO, CAPOTE, 2007; SERRADILLA, CAPOTE, CASTRO, 2007). Um dos fenômenos produzidos quando o ultrassom propaga-se nos líquidos é o fenômeno de cavitação (ESCLAPEZ et al., 2011). A cavitação ocasiona a formação de cavidades, para onde os gases dissolvidos no sistema migram, formando microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão e compressão até que as bolhas implodem, liberando grande quantidade de calor e exercendo elevadas pressões próximas a região da implosão (CASTRO, CAPOTE, 2007; CARCEL et al., 2012; VEILLET et al., 2010). A presença de materiais sólidos no sistema provoca uma implosão assimétrica das microbolhas, gerando jatos que colidem com as superfícies sólidas e também ocasiona a circulação de líquidos, devido à turbulência gerada (CASTRO, CAPOTE, 2007; SHIRSATH et al., 2012). Essas colisões fazem com que células vegetais sejam rompidas, facilitando a difusão do solvente extrator para o interior da matriz (CASTRO, CAPOTE, 2007). Somando-se a isso, o calor liberado pelas implosões aumenta a solubilidade dos analitos, favorecendo o aumento da eficiência da extração (VEILLET et al., 2010). Assim, é possível ao mesmo tempo agitar a mistura e extrair os compostos em um tempo muito mais curto que aqueles utilizados pelos métodos tradicionais de extração, utilizando uma quantidade pequena de solventes (CHEMAT et al., 2011; VILKHU et al., 2008).

Outro efeito que ocorre durante a cavitação é a formação de radicais, que podem eventualmente reagir com os compostos de interesse presentes na amostra, ocasionando a oxidação dos mesmos (SORIA, VILLAMIEL, 2010). Esses radicais são formados devido à dissociação da molécula da água ou de outros gases que possam migrar para o interior da bolha causada pelo calor e a alta pressão produzida durante a implosão das bolhas de cavitação (CASTRO, CAPOTE, 2007).

Esses processos podem ser produzidos por diferentes equipamentos de ultrassom, sendo os mais comumente utilizados o banho de ultrassom e a sonda ultrassônica (JERMAN et al., 2010). O banho de ultrassom é um dispositivo relativamente simples, disposto na

maioria dos laboratórios de química. Entretanto, com o passar do tempo, a energia ultrassônica tende a perder a intensidade e a ser distribuída de maneira não uniforme, o que interfere na repetitividade e reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a posição em que a amostra é colocada no interior do recipiente e o tamanho do mesmo contribuem para a variação dos resultados (CHEMAT et al., 2011). Por outro lado, a sonda ultrassônica tem a vantagem de transmitir a energia em uma região mais discreta, favorecendo os processos de extração (LUQUE-GARCÍA, CASTRO, 2003; PRIEGO-CAPOTE, CASTRO, 2004). Devido à sonicação direta, é conveniente resfriar o sistema de extração, pois a absorção da energia ultrassônica gera um aumento de temperatura (SHIRSATH et al.; 2012), o que pode resultar na degradação de substâncias termolábeis.

Assim como a temperatura de extração, outros parâmetros devem ser analisados quando se utiliza o ultrassom. A frequência utilizada geralmente nos banhos de ultrassom encontra-se entre 20 a 40 kHz, intervalo proporcionado pela maioria dos equipamentos de laboratório (CASTRO, CAPOTE, 2007). Baixas frequências como as de 20 kHz são eficazes para a extração de compostos provenientes de fontes vegetais, sendo predominantes os efeitos físicos gerados pela cavitação (SHIRSATH et al.; 2012). As bolhas formadas em baixas frequências são maiores que as formadas em altas frequências, e implodem de maneira mais violenta, sendo conseqüentemente mais eficientes nos processos de extração (ESCALAPEZ et al., 2011). A cavitação também pode ser influenciada por fatores como: intensidade da sonicação, presença de gases, tamanho de partículas; pressão externa aplicada; viscosidade, tensão superficial e pressão de vapor do solvente, entre outros (CASTRO, CAPOTE, 2007; CÁRCEL et al., 2012). Por isso, deve-se otimizar as condições utilizadas nas reações de extração assistidas por ultrassom, tendo-se o devido cuidado em observar a influência desses fatores no rendimento final do processo.

Japón-Luján et al. (2006a) foram os únicos autores encontrados que efetuaram a extração dos compostos fenólicos das folhas de oliveira utilizando sonda ultrassônica. Através de um sistema de fluxo contínuo de solvente, eles obtiveram elevada concentração de oleuropeína, equivalente a  $22,61 \pm 0.63 \text{ g kg}^{-1}$ , durante 25 min de extração, em temperatura de 40 °C.

Como apenas um trabalho utilizando a sonda na extração dos compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira foi encontrado na literatura, tomaram-se como base outros estudos similares que fizeram uso de outras amostras ou da extração de outros compostos.

Ricárdez et al. (2011) extraíram os compostos polares e apolares da *Heterotheca inuloides* Cass, mais conhecida como arnica, e otimizaram parâmetros como amplitude, tempo de extração, temperatura, posição da sonda, proporção entre amostra/solvente, concentração de solvente, entre outros. Outros autores que também avaliaram esses parâmetros foram Serradilla et al. (2007), que extraíram a fração polar e apolar de amostras sólidas de plantas (alperujo, sementes de uva e de *Quercus ilex*), e Ávila, Capote e Castro (2007), que utilizaram a sonda ultrassônica para extrair os compostos triterpênicos das folhas de oliveira. Esses autores demonstraram que tanto a variação de amplitude (10% a 50%) quanto à posição em que a sonda era localizada no interior da amostra não afetaram na extração dos fenóis. Outros três trabalhos que utilizaram o sistema de banho de ultrassom para extrair os compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira, cujas melhores condições de extração estão descritas na Tabela 2, foram realizados por Skerget et al. (2005), Cárcel et al. (2010) e Sahin, Samli (2013), sendo também utilizados como referência. A partir desse conhecimento prévio, definiu-se como 40% a amplitude utilizada nos testes de extração de compostos fenólicos, e avaliaram-se duas distâncias em que a sonda foi colocada no interior da mistura contendo amostra e solvente. As concentrações e volume de solventes, bem como a proporção de amostra utilizada e o pH do solvente foram determinados de acordo com a metodologia convencional de extração escolhida (MYLONAKI et al. 2008).



### **3 MANUSCRITOS**

#### **3.1 Manuscrito 1**

## **OLIVE LEAVES AS A SOURCE OF FATTY ACIDS AND MINERALS: AN EVALUATION OF DIFFERENT VARIETIES OF SOUTHERN BRAZIL**

**Será submetido à Revista Food Research International**

(Configurado conforme as normas da revista)

# **OLIVE LEAVES AS A SOURCE OF FATTY ACIDS AND MINERALS: AN EVALUATION OF DIFFERENT VARIETIES OF SOUTHERN BRAZIL**

## **Abstract**

Fatty acids and several elements were determined in olive leaves cultivated in Southern Brazil. For the varieties Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki and Grappolo the concentrations of ashes, protein, lipid and total carbohydrates ranged from 4.37% to 6.00%; 10.50% to 13.10%, 9.13% to 9.80%; and 8.74% to 32.63 g%, respectively. The Arbosana was the variety with the highest concentration of total phenolic compounds (35.71 mg GAE g<sup>-1</sup>), and the higher concentration of saturated fatty acids (37.26%, represented by 1.54 ± 0.04% of myristic acid; 26.90 ± 0.50% of palmitic acid; 5.55 ± 0.14% of stearic acid and 3.26 ± 0.13% of arachidic acid). The concentration of oleic acid was higher in varieties Arbosana (21.50 ± 0.80%), Koroneiki (20.80 ± 0.30%) and Grappolo (21.40 ± 0.10%) and all varieties had similar concentrations of linoleic acid (between 6.84 ± 0.18 and 8.26 ± 0.29). The elements present in higher concentration in the 5 varieties studied were Al, Ca, Fe, K, Mg, P, and S. If 50 g of leaves were consumed, the amount of Fe consumed reaches the recommended daily intake and for Cu the amount exceed the recommended value for all varieties. All this results showed the importance of the constitution of these varieties that could be used as supplements in food.

**Keywords:** *Olea europaea* L., PUFA, elements, phenolic compounds.

## 1 Introduction

The *Olea europaea* is an evergreen tree cultivated around the world, especially in Mediterranean countries, where the cultivation is carried out by more than 7000 years (Fares et al., 2011; Lalas et al., 2011). The cultivation of olives covers ten million hectares of land (Coutinho et al., 2009) and the data for the years 2009 and 2010 indicated a world consumption of olive oil and olives equivalent to 2.902.000 and 2.199.000 ton, respectively (Consejo Oleícola Internacional, 2012). Despite some regions of Brazil have the ideal conditions for olive growing the production is insufficient and today the country imports the majority of olive oil and olives commercialized in domestic market (Infobibos, 2010). Brazil is among the ten countries with the highest consumption of olive oil and olives in the world (Consejo Oleícola Internacional, 2012). In the last years, an effort has been performed by Brazilian government in order to promote the production of olives, in special at the south of Brazil. Currently, the area cultivated with olive trees in this region is close to 500 ha (Embrapa, 2012).

In spite of great interest on the production of olives and olive oil from olive trees, nowadays several interesting properties of olive leaves has been reported. These byproducts of olive cultivation showed antioxidant potential (Benavente-Garcia et al., 2000); activity in the treatment of type 2 diabetes (Boaz et al., 2011) and protection of the cells against the oxidative damage caused by hydrogen peroxide without genotoxicity (Anter et al., 2011). Poudyal et al. (2010) showed that rats fed with a diet reach in carbohydrates and lipids supplemented with olive leaves extract attenuated cardiac, hepatic, and metabolic changes. Botsoglou et al. (2010) and Martins et al. (2009) demonstrated that the use of leaves in animal feed improve the meat quality, reducing the lipid oxidation. Olive leaves rich in oil allowed a decrease of ruminal protozoa, and this could increase the efficiency of microbial protein

synthesis in the rumen (Molina-Alcaide, Yanez-Ruiz, 2008). For lactating animals, olive leaves feed resulted in an improvement in milk fat quality compared to diets based on conventional forages (Molina-Alcaide, Yanez-Ruiz, 2008). Therefore, olive leaves could be considered as an important raw-material that have potential to be used for animal feed (Molina-Alcaide, Yanez-Ruiz, 2008), but they could be use also for improvement of human health (Anter et al., 2011).

Several studies have been carried out to evaluate the antioxidant properties of olive leaves due to their high content of phenolic compounds (Kiritsakis et al., 2010; Xynos et al., 2012), in special oleuropein and its derivative (hydroxytyrosol), which are the substances in higher amount in the leaves and directly related to biological effects (Erbay, Icier, 2010). Despite the great interest in the phenolic compounds in olive leaves, few works have been performed to evaluate the presence of other compounds with biological activity in this material, such as fatty acids. The olive oil is composed mainly by palmitic, oleic and linoleic acids, and in minor amount by the palmitoleic, stearic, linolenic and arachidic acids (Manai-Djebali, 2012) and several health benefits of olive oil consumption are related to these substances (Miranda et al., 2010). Considering that these compounds are present in olives, Tsiplakou and Zervas (2008) investigated their presence in olive leaves and found a similar composition. These authors used the olive leaves as dietary ingredients for sheep and goats feeding and observed an increase of *cis*-9 *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of these animals. Therefore, the olive leaves could have other substances with potential benefits to health in addition to phenolic compounds, but few studies have been carried out to evaluate them. In this way, this study was proposed to evaluate the centesimal composition, total lipids, fatty acids, total phenolics and minerals present in different varieties of olive leaves grown in southern Brazil. Considering the importance that this new crop produced in

southern Brazil, five varieties of *Olea Europaea* were studied and a principal component analysis (PCA) was performed in order to evaluate the differences among the compounds produced by each one.

## **2 Materials and methods**

### ***2.1 Chemical and standards***

The following reagents were obtained from VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brazil) in analytical grade: citric acid monohydrate, chloroform, methanol, hexane, potassium hydroxide, sodium carbonate, sulfuric acid, bromocresol green, methyl red and ethanol. Butylhydroxytoluene (BHT) and anhydrous sodium sulfate were obtained from ECIBRA (São Paulo, SP, Brazil). Gallic acid was purchased from Sigma (St. Louis, MO., U.S.A.); Folin Ciocalteu reactive and potassium sulfate were obtained from Proquímios (Rio de Janeiro, RJ, Brazil); copper sulphate from Belga química (Curitiba, PR, Brazil); sodium hydroxide from Labsynth (Diadema, SP, Brazil); boric acid indicator from CAQ (Diadema, SP, Brazil), and analytical-grade nitric acid was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled-deionized water (Milli-Q, 18.2M $\Omega$ cm, Millipore, Billerica, MA, USA) were used to prepare samples and standards. Argon (99.996%, White Martins-Praxair, São Paulo, SP, Brazil) was used in ICP-OES determinations for plasma generation, nebulization, auxiliary gas. Oxygen (99.9991%, White Martins-Praxair) was used as reagent in digestions performed under oxygen pressure. For GC analysis, it was used hydrogen as the carrier gas. The standards used for determination of fatty acids were those available in Mix 37 (SUPELCO, USA). Accuracy of mineral determination was evaluated using a certified reference material (CRM) of trace

elements in olive leaves (BCR 62) produced by Community Bureau of Reference (BCR, Brussels, Belgium).

## ***2.2 Plant material and sampling***

Leaves of *O. europaea* varieties Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki and Grappolo were harvest in Chapecó (Santa Catarina- Brazil; latitude -27 ° 05' 4" and longitude 52 ° 37' 06") in the second week of February (summer) of 2012, from trees with six years old. In order to obtain a uniform amount of leaves, the samples were collected from several trees and from different parts in order to minimize the effect of sun exposure and differences related to different maturation stages. The samples were dried using an oven with air circulation at  $45 \pm 5$  °C during 48 h. After, they were ground in vertical rotor mill (Marconi, MA-340) and the powder was stored at - 20 °C, protected from direct light before analysis.

## ***2.3 Procedure for chemical composition evaluation***

In order to evaluate the olive leaves, a basic chemical composition was carried out according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995) in triplicates. The samples were weighed in an analytical balance (model 250 A, max 250 g, 0.1 mg of resolution, BEL, Brazil). Moisture content was measured by loss on drying in an oven with air circulation at 105 °C up to constant weight (5 h). Ash content was determined in a muffle at 550 °C up to constant weight (7 h). The determination of protein content of olive leaves were carried out by micro Kjeldhal method. Total carbohydrate content was estimated by difference. The lipid extraction of olive leaves was performed by Bligh-Dyer method (1959)

with some modifications. Around 3 g of olive leaves powder were used and 8 mL of chloroform (plus 0.02% BHT), 16 ml of methanol and 6.4 mL of distilled water were added. After, the tubes were shaken on a shaker table (Aaker, Brazil) for 30 min. Then, it was added more 8 mL of chloroform and 8 mL of 1.5% (w/v) sodium sulfate with stirring by 2 minutes. Then, the tubes were centrifuged by 5 min at 3000 rpm. The samples were filtered with qualitative filter paper containing 1 g of anhydrous sodium sulfate and 5 mL from the filtrate were transferred to a beaker previously dried, and the chloroform was evaporated under a laminar flow hood. The beakers were placed in an oven with air circulation at 105 °C for evaporating the residual water and then the lipid residue was weighed.

#### ***2.4 Determination of total phenolic content***

The extraction of the phenolic compounds was based on the procedure described by Mylonaki et al. (2008), with some modifications. It was used 0.5 g of dried olive leaves powder from the different varieties with addition of 20 mL of 60% (v/v) ethanolic solution (with 1 g L<sup>-1</sup> citric acid). The extraction was performed by 5 h at 22 ± 2 °C with magnetic stirring (THELGA TMA 10C, MG, Brazil) and under protection of the light. The extracts were after submitted for more one extraction in order to perform an exhaustive extraction of phenolics. The extractions were carried out in triplicates.

Total phenolic content of leaves was determined according to the Folin–Ciocalteu procedure reported by Singleton and Rossi (1965). Aliquots of 200 µL of extracts were diluted in the ratio 1:40 and were transferred to test tubes with the extraction solution, and were promptly added by 1000 µL of Folin-Ciocalteu solution diluted in the ratio 1:10. The tubes were stirred and allowed to stand for 8 min. Then, 800 µL of 7.5% (w/v) sodium carbonate solution was added. After stirring and stand for 2 h, the absorbance was read at 765

nm using a spectrophotometer (JENWAY UV- 6300 Jenway, UK) calibrated with reference solutions of gallic acid. The total phenol content was expressed as gallic acid equivalents in milligrams per gram of dried sample (mg GAE g<sup>-1</sup>).

### ***2.5 Determination of fatty acids***

For the determination of fatty acids, the lipid extracted by the method of Bligh-Dyer was esterified using the procedure suggested by Hartman and Lago (1973) with some modifications, using KOH solution (0.4 mol L<sup>-1</sup>) and sulfuric acid (1 mol L<sup>-1</sup>) in methanol. The methyl esters of fatty acids were dissolved in hexane and were determined using a gas chromatography (GC, model Varian Star 3400 CX<sup>®</sup>) coupled a flame ionization detector (FID) with a capillary column model ZBFFAP (60 m x 0.25 mm x 0.25 mm). The sample volume injected into the GC was 1 µL. A column with temperature program which began at 50 °C and remaining for 1 minute at this temperature was used for separation of fatty acids. After, an increasing at a rate of 40 °C.min<sup>-1</sup> was carried out to 180 °C and then to 220 °C with a gradient of 1 °C min<sup>-1</sup>, and increased to 230 °C, rising at a rate of 20 °C min<sup>-1</sup>, remaining in isothermal conditions for 2 minutes. The total running time was 46.75 min. The carrier gas used was hydrogen at a pressure of 40 psi with an initial flow rate of 3 mL min<sup>-1</sup> and split ratio of 1:50.

### ***2.6 Determination of mineral content***

The determination of mineral content was evaluated according the method proposed by Bizzi et al. (2011). A microwave oven (Multiwave 3000 microwave sample preparation system, Anton Paar, Graz, Austria) equipped with eight high-pressure quartz vessels was used



in the experiments. Analytes were determined by ICP-OES using an axial view configuration spectrometer (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany). Nebulization was performed through a cross-flow nebulizer coupled to a Scott double pass type nebulization chamber. The plasma, auxiliary and nebulizer gas flow rates were 14.0, 1.0 and 0.85 L min<sup>-1</sup>, respectively. The radiofrequency power of 1600 W was used and the following wavelengths (in nm; I for atomic and II for ionic lines) were chosen: Al (308.215, I), Ba (233.527, II), Ca (396.847, I), Cd (214.438, II), Co (238.892, II), Cr (267.316, II), Cu (324.752, I), Fe (239.562, II), K (766.490, I), Mg (285.213, I), Mn (257.610, II), Na (589.592, I), Ni (231.604, II), P (214.914, I), S (180.669, I), Sb (206.833, I), Se (196.026, I), Sr (421.552, II), V (290.880, II) and Zn (206.200, II). They were used as recommended by the instrument manufacturer (Spectro Ciros, 2003).

### ***2.7 Statistical analysis***

All experimental results were performed in triplicate and the data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and significant differences among means were determined by Tukey test at  $p < 0.05$  by Statistica software (StatSoft Inc, 7.0, Tulsa OK, USA, 2004). Principal component analysis (PCA) was performed by Pirouette 3.11 statistical analysis software.

## **3 Results and discussion**

The Grappolo and Koroneiki varieties presented the highest protein content (13.08  $\pm$  0.15% and 12.50  $\pm$  0.20%, respectively) when they are compared with the other ones, as can

be seen in **Table 1**. The Grappolo variety showed the highest amount of carbohydrates and the lowest moisture, while the Negrinha do Freixó variety presented the highest moisture values and the lowest content of carbohydrates. This can be observed in PCA (**Figure 1**) with varieties in the opposite sides of the axis, representing an inverse relationship between carbohydrate and moisture of each variety.

### **Table 1**

### **Figure 1**

The total concentration of phenolics extracted in the first extraction and re-extractions for varieties Koroneiki, Grappolo, Ascolano, Negrinha do Freixó and Arbosana were: 27.37; 27.60; 30.76; 31.93 and 35.71 mg GAE g<sup>-1</sup>, respectively. The Arbosana was the variety with the highest concentration of total phenolics, and this result was statistically different from all the others varieties when only one extraction was performed ( $28.82 \pm 0.78$  mg GAE g<sup>-1</sup>) and when more one extraction was performed ( $6.90 \pm 0.53$  mg GAE g<sup>-1</sup>). These results are confirmed by the analysis of PCA that presented the greatest correlation between phenolic compounds and Arbosana variety (**Figure 2**). When one extraction was performed for others varieties, the concentration of phenolics were  $21.59 \pm 0.70$ ;  $22.19 \pm 0.87$ ;  $25.25 \pm 0.65$  and  $26.18 \pm 0.44$  mg GAE g<sup>-1</sup> for Grappolo, Koroneiki, Ascolano and Negrinha do Freixó respectively. The values for re-extractions to same varieties were  $6.01 \pm 0.12$ ;  $5.18 \pm 0.26$ ;  $5.51 \pm 0.07$  and  $5.75 \pm 0.36$  mg GAE g<sup>-1</sup>, respectively. One similar study was performed by Abaza et al. (2011). They extracted the phenolic compounds from olive leaves of Chétoui variety using 1 g of sample, 10 mL of 70% ethanol (v/v) and 24 h of extraction. They found a total phenolic content ( $24.36 \pm 0.85$  mg GAE g<sup>-1</sup>) similar than that found in the present work for the variety Ascolano, when one extraction was performed.

### **Figure 2**

For total lipids all varieties showed values that did not differ statistically and ranged from  $9.13 \pm 0.14\%$  to  $9.80 \pm 0.24\%$ . The Arbosana variety showed the highest value ( $9.80 \pm 0.24\%$ ) and was positioned in a different position in PCA, which correlates the variety with the higher lipid content (**Figure 2**). Boudhrioua et al. (2009) analyzed the chemical composition of olive leaves from varieties Chemlali, Chetoui, Chemchali and Zarrazi, cultivated in Tunisia, and found a protein and lipid values lower than those found in this study (ranging from  $5.50 \pm 0.15$  to  $7.61 \pm 0.27\%$ ; and  $1.05 \pm 0.11$  to  $1.30 \pm 0.18\%$ , respectively). Erbay and Icier (2009) analyzed the composition of olive leaves from variety Memecik, cultivated in Turkey, and also found a value smaller than the value found in this study for protein ( $5.45 \pm 0.22\%$ ) and total lipids ( $6.54 \pm 0.27\%$ ). Martín García et al. (2003) determined the protein and lipids content of olive leaves in Spain, which were used to feed goats and sheep and found 7.0% and 3.21% for protein and lipids, respectively. These results demonstrated that the concentration of total lipid content of varieties cultivated in southern Brazil was higher than other varieties cultivated in other regions of the world. These findings could be considered important in special if essential fatty acids are present. In this way, the main fatty acid composition of olive leaves of different varieties was determined (**Table 2** and **Figure 3**).

The results showed that the variety Arbosana had the lowest concentration of polyunsaturated fatty acids, and the results for others varieties did not differ statistically. This variety also showed the higher concentration of saturated fatty acids. These results are in agreement with those showed in the PCA analysis (**Figure 2**) which demonstrated a correlation between saturated fatty acids and Arbosana variety, and also a lower content of C18:3n:3 in this cultivar. The concentration of monounsaturated fatty acids was higher in varieties Arbosana, Koroneiki and Grappolo, which the results did not differ statistically.

Nevertheless, Arbosana showed the highest value of fatty acids monounsaturated (21.46%), with a correlation between the same variety with the fatty acid C18:1n:9 (**Figure 1**). Tsiplakou and Zervas (2008) studied olive leaves (the variety was not informed) and found the following values of fatty acids: C14:0 ( $2.1 \pm 0.1\%$ ), C16:0 ( $21.0 \pm 0.51\%$ ), C18:0 ( $2.4 \pm 0.06\%$ ) and C18:1 ( $12.8 \pm 0.36\%$ ), whose concentrations were lower than those found in this study for all the varieties, except for myristic acid, that concentration was higher; C18:2n:6c ( $13.1 \pm 0.79\%$ ) representing a content greater than the varieties analyzed, and C18:3n:3 ( $37.0 \pm 0.66\%$ ), that is in agreement with the results found in this work (results between  $34.39 \pm 1.11$  and  $41.27 \pm 2.35\%$ ). These fatty acids are the same found in the olive oil, which have been related with several benefits to the health, like the low incidence of cardiovascular diseases in mediterranean people, that have a traditional diet based in abundant presence of olive oil (Canela and González, 2011). The benefits of olive oil is based on your fatty acids and other minor compounds, like the phenolics (Manai-Djebali, 2012). In this way, the olive leaves could be considered as a potential source of fatty acids.

## **Table 2**

## **Figure 3**

The results of mineral content of olive leaves studied are shown in **Table 3**. Results obtained for Al, Cu, Mn and Zn in CRM presented good agreement (better than 92%) without difference among the certified and found values (Student's t test,  $p < 0.05$ ). In general, the elements present in higher concentration in the five varieties studied were: Al, Ca, Fe, K, Mg, P, and S, which are directly correlated with the ash content of samples observed in PCA analysis (**Figure 2**). This is expected due to the complete oxidation of organic substances in temperatures above 500 °C, leaving in the ash the oxides of these elements.

## **Table 3**

The olive leaves representing an important group of feed resources for ruminants in the Mediterranean areas, and the potential toxic effect of feeding with olive leaves is not yet known (Molina-Alcaide and Yanez-Ruiz, 2008). For human consumption no data were found and the results were evaluated for each element considering the dietary intake of 50 g of dried olive leaves per day (**Table 4**). All varieties showed high concentrations of Fe, when the consumption of 50 g of varieties Arbosana and Ascolano cause an intake of 100% of the recommended daily ingested of this mineral. For Cu, the ingestion of the same quantity of leaves selecting any variety cause more than 100% of the recommended daily intake. These results demonstrate the olive leaves could be a source of these minerals, but also of Ca, Mg, Zn and Mn, which have intermediate concentrations. Importantly, even though the amount of these elements is high, larger studies are needed to verify the bioavailability of these elements, because some substances (eg. phytates) can prevent the absorption of the same (Akwaowo, Ndon, Etuk, 2000; Sans-Panella et al. 2013).

#### **Table 4**

When analyzing the results of PCA, it can be observed that varieties have characteristics that differ each other and they can be separated into two groups: one group consisting by Arbosana, disposed on the left side of the shaft, and another group consisting of the other varieties, disposed from the center to the right side of the shaft (**Figure 2**). This division is due to higher concentrations of saturated fatty acids and phenolic compounds present in varieties Arbosana relative to values found in other varieties.

#### **4 Conclusions**

These results demonstrated the importance of the constitution of the olive leaves varieties that could be a resource of mineral, important fatty acids, and phenolic compounds, contributing to the maintenance of appropriate levels of nutrients for the body or even for animal feed. It is important that more studies be conducted in order to understand the bioavailability of these nutrients when the olive leaves are used to supplement animal and human feed. The varieties cultivated in Southern Brazil have a better composition than others cultivated around the world and should be considered as a potential a source of fatty acids and minerals. The variety Arbosana, through PCA analysis, showed the highest values of lipids, phenolics and saturated fatty acids, and the slightest values of C18:3n:3. The Ascolano, Koroneiki and Grappolo were the varieties with the highest concentration of the fatty acids beneficial to health (respectively 68.03%; 68.63% and 68.18% of total monounsaturated and polyunsaturated fatty acids) and Ascolano showed generally higher concentrations of most minerals determinate.

#### **5 Acknowledgements**

Our thanks to all coworkers who cooperating to conduct this study, especially Matheus Rafael Raschen (*in memoriam*) and Carolina Corte Real (*in memoriam*). This research has been financed by CAPES, CNPq and UFSM.

## 6 Appendices

Table 1 Chemical composition of different varieties of olive leaves. Values (%) are reported as of dry mass, n=3.

<b>Varieties</b>	<b>Moisture</b>	<b>Ashes</b>	<b>Protein</b>	<b>Lipid</b>	<b>Total carbohydrates</b>
<b>Arbosana</b>	59.33 ± 0.03 <sup>D</sup>	4.65 ± 0.25 <sup>C</sup>	10.50 ± 0.50 <sup>C</sup>	9.80 ± 0.24 <sup>A</sup>	16.70 ± 0.40 <sup>B</sup>
<b>Ascolano</b>	59.72 ± 0.04 <sup>C</sup>	6.00 ± 0.21 <sup>A</sup>	11.80 ± 0.20 <sup>B</sup>	9.75 ± 0.50 <sup>A</sup>	12.75 ± 0.10 <sup>C</sup>
<b>Grappolo</b>	39.30 ± 0.01 <sup>E</sup>	4.37 ± 0.05 <sup>B</sup>	13.10 ± 0.15 <sup>A</sup>	9.64 ± 0.20 <sup>A</sup>	32.63 ± 0.30 <sup>A</sup>
<b>Koroneiki</b>	61.91 ± 0.03 <sup>B</sup>	4.85 ± 0.01 <sup>C</sup>	12.50 ± 0.20 <sup>AB</sup>	9.19 ± 0.25 <sup>A</sup>	11.60 ± 0.10 <sup>D</sup>
<b>Negrinha do Freixó</b>	64.80 ± 0.03 <sup>A</sup>	5.36 ± 0.20 <sup>B</sup>	12.00 ± 0.30 <sup>B</sup>	9.13 ± 0.14 <sup>A</sup>	8.74 ± 0.53 <sup>E</sup>

Averages ± standard deviation followed by capital in the same column, do not differ (p<0,05) by Tukey Test.

Table 2 Main fatty acids present in varieties of olive leaves evaluated.

Varieties	Fatty Acids (%)						
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1n:9c	C18:2n:6c	C18:3n:3c	C20:0
	Myristic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid	Arachidic acid
<b>Arbosana</b>	1.54 ± 0.04 <sup>Af</sup>	26.90 ± 0.50 <sup>ABb</sup>	5.55 ± 0.14 <sup>Ad</sup>	21.50 ± 0.80 <sup>Ac</sup>	6.88 ± 0.16 <sup>Ad</sup>	34.40 ± 1.10 <sup>Ba</sup>	3.26 ± 0.13 <sup>Ac</sup>
<b>Ascolano</b>	0.85 ± 0.05 <sup>Df</sup>	24.60 ± 0.80 <sup>CDb</sup>	4.55 ± 0.29 <sup>Bde</sup>	19.90 ± 0.60 <sup>Bc</sup>	6.84 ± 0.18 <sup>Ad</sup>	41.30 ± 2.30 <sup>Aa</sup>	1.99 ± 0.42 <sup>BDef</sup>
<b>Grappolo</b>	0.77 ± 0.04 <sup>Dg</sup>	25.70 ± 0.10 <sup>BCb</sup>	3.89 ± 0.13 <sup>Ce</sup>	21.40 ± 0.10 <sup>Ac</sup>	7.46 ± 0.14 <sup>Ad</sup>	39.30 ± 0.10 <sup>Aa</sup>	1.45 ± 0.05 <sup>CDf</sup>
<b>Koroneiki</b>	1.36 ± 0.11 <sup>Be</sup>	23.00 ± 1.00 <sup>Db</sup>	4.68 ± 0.18 <sup>Bd</sup>	20.80 ± 0.30 <sup>ABb</sup>	7.55 ± 1.89 <sup>Ac</sup>	40.30 ± 1.50 <sup>Aa</sup>	2.36 ± 0.11 <sup>Bde</sup>
<b>Negrinha do Freixó</b>	1.11 ± 0.04 <sup>Cf</sup>	27.50 ± 0.40 <sup>Ab</sup>	4.60 ± 0.22 <sup>Be</sup>	19.80 ± 0.50 <sup>Bc</sup>	8.26 ± 0.29 <sup>Ad</sup>	38.60 ± 0.80 <sup>Aa</sup>	2.08 ± 0.41 <sup>BCf</sup>

Averages ± standard deviation followed by the same lowercase in the same line and the same capital letters in the same column, do not differ (p<0.05) by Tukey Test.



Table 3 Elements determined in the olive leaves varieties studied. Values are reported as  $\mu\text{g g}^{-1}$  of dry mass.

Element	VARIETIES					BCR 62	
	Arbosana	Ascolano	Grappolo	Koroneiki	Negrinha do Freixó	Value found	Certified value
<b>Al</b>	292 ± 33 <sup>ab</sup>	328 <sup>a</sup>	227 ± 25 <sup>ad</sup>	208 ± 8 <sup>acd</sup>	255 ± 45 <sup>ac</sup>	433 ± 14	450 ± 20
<b>Ba</b>	8.12 ± 0.73 <sup>b</sup>	17.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	7.35 ± 0.41 <sup>b</sup>	7.18 ± 0.53 <sup>b</sup>	-	-
<b>Ca</b>	8125 ± 18 <sup>b</sup>	10985 ± 6 <sup>a</sup>	10848 ± 239 <sup>a</sup>	8235 ± 167 <sup>b</sup>	11212 ± 71 <sup>a</sup>	-	-
<b>Cu</b>	42.9 ± 0.4 <sup>ab</sup>	32.1 ± 0.1 <sup>bc</sup>	28.7 ± 2.9 <sup>c</sup>	28.2 ± 0.5 <sup>c</sup>	45.1 ± 5.4 <sup>a</sup>	45.2 ± 1.4	46.6 ± 1.8
<b>Fe</b>	307 ± 29 <sup>ab</sup>	326 ± 1 <sup>a</sup>	237 ± 13 <sup>ad</sup>	231 ± 3 <sup>bcd</sup>	260 ± 40 <sup>ac</sup>	-	-
<b>K</b>	14643 ± 178 <sup>c</sup>	18106 ± 162 <sup>a</sup>	16209 ± 215 <sup>bcd</sup>	16708 ± 27 <sup>ac</sup>	16804 ± 717 <sup>abd</sup>	-	-
<b>Mg</b>	1221 ± 30 <sup>c</sup>	1930 ± 70 <sup>a</sup>	1908 ± 99 <sup>a</sup>	1173 ± 12 <sup>c</sup>	1520 ± 32 <sup>b</sup>	-	-
<b>Mn</b>	28.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	36.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	24.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	17.6 <sup>e</sup>	20.3 ± 0.4 <sup>d</sup>	55.3 ± 0.5	57.0 ± 2.4
<b>Na</b>	26.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>	27.8 ± 2.4 <sup>a</sup>	16.8 ± 3.1 <sup>c</sup>	14.5 ± 0.3 <sup>c</sup>	19.4 ± 1.1 <sup>bc</sup>	-	-
<b>P</b>	3029 ± 20 <sup>a</sup>	1644 ± 64 <sup>d</sup>	2586 ± 65 <sup>b</sup>	2024 ± 28 <sup>c</sup>	1818 ± 45 <sup>d</sup>	-	-
<b>S</b>	2585 ± 95 <sup>a</sup>	2344 ± 15 <sup>a</sup>	2310 ± 133 <sup>a</sup>	2325 ± 57 <sup>a</sup>	1971 ± 45 <sup>b</sup>	-	-
<b>Sr</b>	14.5 ± 0.6 <sup>c</sup>	22.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	18.2 ± 1.0 <sup>b</sup>	10.4 ± 0.7 <sup>d</sup>	20.7 ± 1.0 <sup>ab</sup>	-	-
<b>Zn</b>	24.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	23.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	18.9 ± 1.0 <sup>b</sup>	19.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	24.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	15.8 ± 0.1	16.0 ± 0.7

Averages ± standard deviation followed by lowercase in the same line, do not differ ( $p < 0.05$ ) by Tukey Test.

Table 4 Element content in 50 g of each variety of olive leaves and its relation with recommended daily intake.

Element	Recommended daily intake (%)				
	Arbosana	Ascolano	Grappolo	Koroneiki	Negrinha
<b>Ca</b>	40.63 <sup>b</sup>	54.93 <sup>a</sup>	54.24 <sup>a</sup>	41.17 <sup>b</sup>	56.06 <sup>a</sup>
<b>Fe</b>	109.82 <sup>ab</sup>	116.43 <sup>a</sup>	84.82 <sup>ad</sup>	82.68 <sup>bcd</sup>	92.68 <sup>ac</sup>
<b>Mg</b>	23.50 <sup>c</sup>	37.11 <sup>a</sup>	36.69 <sup>a</sup>	22.56 <sup>c</sup>	29.23 <sup>b</sup>
<b>Zn</b>	17.32 <sup>a</sup>	16.86 <sup>a</sup>	13.50 <sup>b</sup>	13.57 <sup>b</sup>	17.36 <sup>a</sup>
<b>P</b>	21.64 <sup>a</sup>	11.74 <sup>d</sup>	18.47 <sup>b</sup>	14.46 <sup>c</sup>	12.99 <sup>d</sup>
<b>Cu</b>	236.30 <sup>ab</sup>	178.05 <sup>bc</sup>	159.72 <sup>c</sup>	156.38 <sup>c</sup>	250.28 <sup>a</sup>
<b>Mn</b>	61.08 <sup>b</sup>	78.47 <sup>a</sup>	52.72 <sup>c</sup>	38.26 <sup>e</sup>	44.24 <sup>d</sup>
<b>K</b>	15.58 <sup>e</sup>	19.26 <sup>a</sup>	17.24 <sup>bcd</sup>	17.77 <sup>ac</sup>	17.87 <sup>abd</sup>
<b>Na</b>	0.09 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.06 <sup>b</sup>
<b>S</b>	0.05 <sup>c</sup>	4.18 <sup>a</sup>	4.12 <sup>a</sup>	4.15 <sup>a</sup>	3.52 <sup>b</sup>

The data were calculated according to the values in the recommended daily intake (RDI) of minerals for adults, according to FAO/OMS (2001) and Institute of Medicine (1999-2011).

Mean  $\pm$  standard deviation followed by lowercase in the same line, do not differ ( $p < 0.05$ ) by Tukey Test.

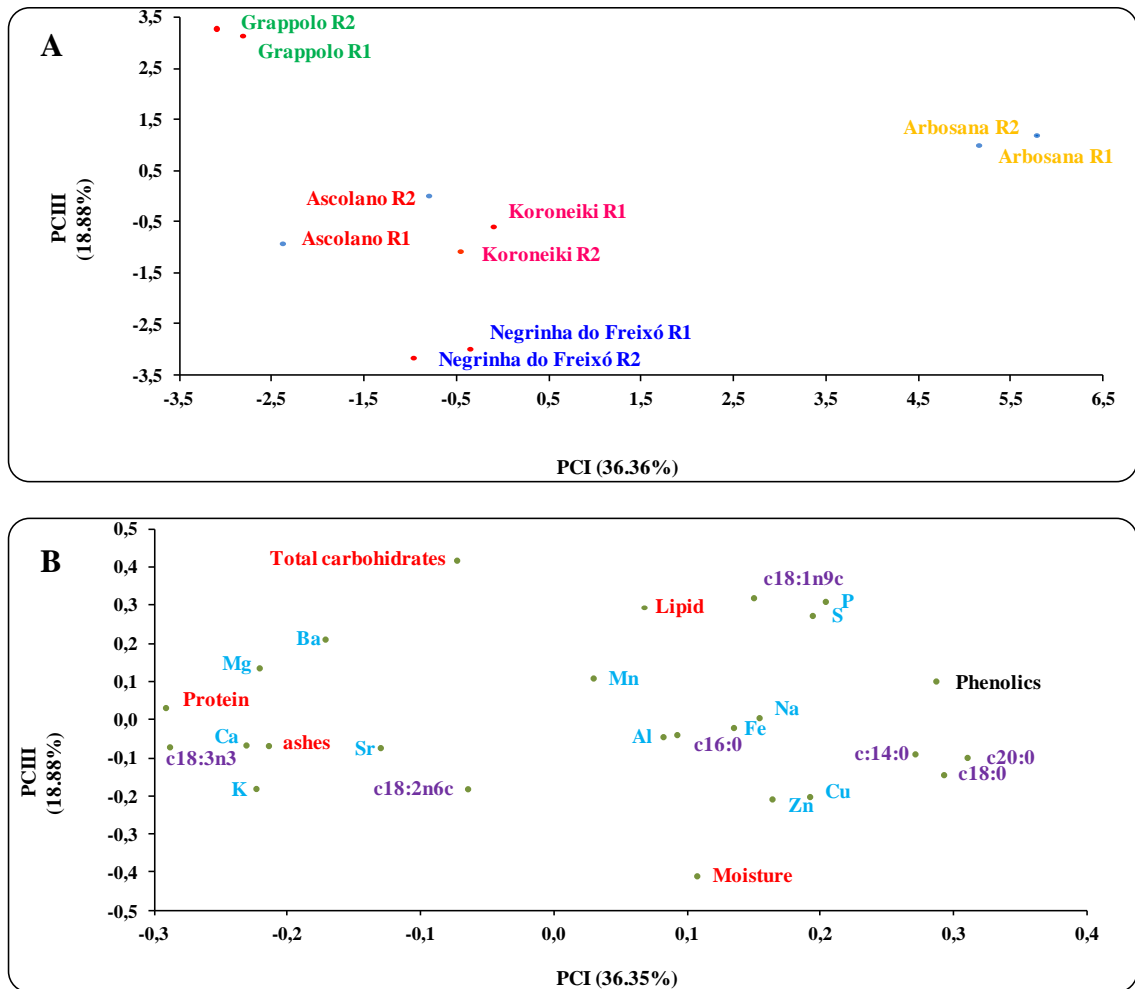


Figure 1 Graph of scores (samples, A) and weights (variables, B) of the first and third principal components of PCA regarding to chemical composition of olive leaves samples.

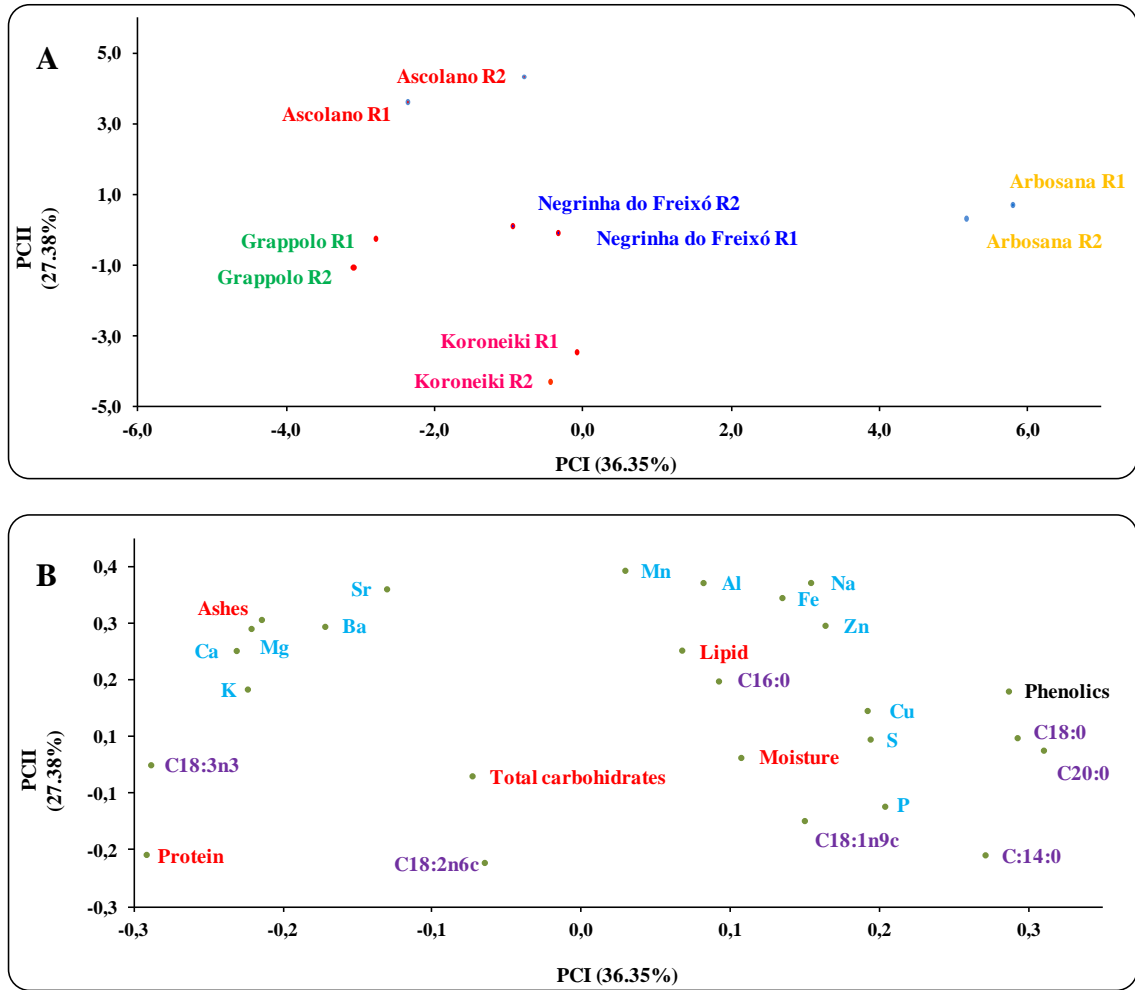


Figure 2 Graph of scores (samples, A) and weights (variables, B) of the second and third principal components of PCA regarding to chemical composition of olive leaves samples.

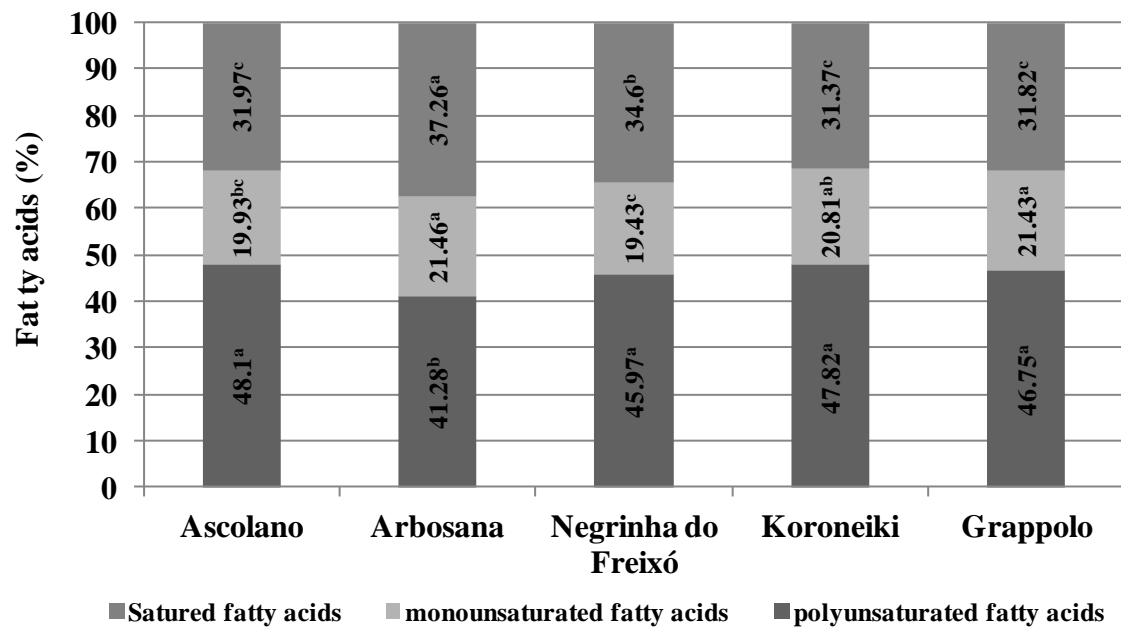


Figure 3 Amount of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids content (%) in olive leaves studied.

Averages  $\pm$  standard deviation followed by lowercase in the columns with the same color, do not differ ( $p < 0.05$ ) by Tukey Test.

## 7 References

- Abaza, L.; Youssef, N. B.; Manai, H.; Haddada, F. M.; 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.
- Akwaowo, E. U.; Ndon, B. A.; Etuk, E. U. (2000). Minerals and antinutrients in fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis Hook f.*). *Food Chemistry* 70, 235- 240.
- Anter, J.; Bedmar, Z. F.; Pulido, M. V.; Peyras, S. D.; Millán, M.M.; Moraga, A. A.; Serrano, A. M.; Castro, M. D. L. (2011). A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutation Research*, 723, 165-170.
- AOAC (1995). *Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis* (16th ed.). Arlington, USA.
- Benavente-Garcia, O. et al. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves. *Food Chemistry*, 68, 457– 462.
- Bizzi, C. A; Barin, J. S.; Müller, E. I.; Schmidt, L.; Nóbrega, J. A.; Flores, E. M. M. (2011). Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. *Talanta*, 83, 1324–1328.
- Bligh, E. G, Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*, 37, 911-917.

Boaz, M.; Leibovitz, E.; Dayan, Y. B.; Wainstein, J. (2011). Functional foods in the treatment of type 2 diabetes: olive leaf extract, turmeric and fenugreek, a qualitative review. *Functional Foods in health and Disease*, 11, 472- 481.

Botsoglou, E.; Govaris, A.; Christaki, E.; Botsoglou, N. (2010). Effect of dietary olive leaves and/or a-tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 121, 17–22.

Boudhrioua, N.; Bahloul, N.; Slimen, I. B.; Kechaou, N. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29, 412–419.

Boza, J., Guerrero, J.E. (1981). Nutritive value of some agricultural by-products in goats. In: Morand-Fehr, P., Bourbouze, A., de Simiane, M. (Eds.), *Nutrition and Goats Feeding Systems*. ITOVIC, Tours, 635– 642.

Canela, M. R.; González, M. A. M. (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, 68, 245–250.

Chatzistathis, T.; Therios, I.; Aligrakis, D.; Dimassi, K. (2010). Effect of sampling time and soil type on Mn, Fe, Zn, Ca, Mg, K and P concentrations of olive (*Olea europaea L.*, cv. ‘Koroneiki’) leaves. *Scientia Horticulturae*, 126, 291-296.

Consejo Oleícola Internacional (2012). *Revista Oficial del Consejo Oleícola Internacional*, Madri, 117, 1-72.

Coutinho, E. F.; Ribeiro, F. C.; Cappellaro, T. H.; Araújo, F.A. (2009). Mercados e comercialização. In: Coutinho, Ribeiro and Cappellaro (Org.). *Cultivo de oliveira (Olea europaea L.)*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009, 102-115.

Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Imprensa: *Embrapa discute a Olivicultura*. Available in: <http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/24102012.php>> Accessed in: 06 nov. 2012.

Erbay, Z.; Icier, F. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. (2009). *Journal of Food Engineering*, 91, 533–541.

Erbay, Z.; Icier, F. (2010) The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International*, 26, 319–334.

Escobar, R. F.; Moreno, R.; Creus, M. G. (1999). Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Scientia Horticulturae*, 82, 25-45.

FAO/OMS. Human vitamin and mineral requirements. In report of 7<sup>a</sup> Joint FAO/OMS Expert Conultation. Bangkok, Thailand, 2001. Xxii +286 p.



Fares, R.; Bazzi, S.; Baydoun, S. E.; Roula, M.; Massih, A. (2011). The Antioxidant and Anti-proliferative Activity of the Lebanese *Olea europaea* Extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 58-63.

Gomez Cabrera, A., Parellada, J., Garrido, A., Ocaña, F.(1982). Olive leaves utilisation in animal feeding. II. Nutritive value. *Avances en Alimentacion y Mejora Animal*. XXIII, 75-77.

Hartmann, L.; Lago, R. C. A. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, 22, 475-477.

Higueras, P.; Amarós, J. A.; Esbrí, J. M.; Navarro, F. J. G.; Reyes, C. P.; Moreno, G. (2012). Time and space variations in mercury and other trace element contents in olive tree leaves from the Almadén Hg-mining district. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 143-151.

Infobibos, Organization of Scientific Events and Training Courses. History of the introduction of olive growing in Brazil. Available from: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_4/HistoricoOliveira/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/Index.htm)> access in 29.08.2012.

Institute of Medicine (1999-2011). Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes. *National Academic Press*, Washington D.C. Available from: <<http://www.nap.edu/topics.php?topic=380>> access in 01.10.2012.

Kiritsakis, K.; Kontominas, M. G.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D.; Moustakas, A.; Kiritsakis, A. (2010). Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 369–376.

Lalas, S. et al. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, 127, 1521-1525.

Manai-Djebali, H.; Krichène, D.; Ouni, Y.; Gallardo, L.; Sánchez, J.; Osorio, E.; Daoud, D.; Guido, F.; Zarrouk, M. (2012). Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27 (2), 109-119.

Martín García, A. I.; Moumen, A.; Yáñez Ruiz, D. R.; Molina Alcaide, E. (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107, 61–74.

Martins, F. P.; Barbosa, S.; Pinheiro, V.; Mourão, J. L.; Monteiro, D. O. (2009). The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. *Meat Science*, 82, 438–443.

Miranda, J. L. et al. (2010). Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20, 284-294.

Molina-Alcaide, E.; Yáñez-Ruiz, D. R. (2008). Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 247-264.

Mylonaki, S.; Kiassos, E.; Makris, D.P.; Kefalas, P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 977-985.

Oliva, Brazilian Association of Producers, Importers and Traders of Olive Oils. History and origin of the oil. Available from: <<http://www.oliva.org.br/conhecendo-o-azeite.php>> access in 29.08.2012.

Ozkaya, M. T.; Ergulen, E.; Ulger, S.; Ozilbey, N. (2008). Molecular, morphological and oil composition variability within olive (*Olea europaea* l.) at semi-arid conditions. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22, 699-704.

Poudyal, H.; Campbell, F.; Brown, L. (2010). Olive Leaf Extract Attenuates Cardiac, Hepatic, and Metabolic Changes in High Carbohydrate, High Fat–Fed Rats. *The Journal of Nutrition*, 110, 946- 953.

Sans-Panella, J. M.; Wronkowska, M.; Soral-Smietana, M.; Haros, M. (2013). Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *Food Science and Technology*, 50, 679- 685.

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.

Spectro Ciros CCD, software version 01/March 2003, Spectro Analytical Instruments GmbH & Co. KG: Kleve, Germany.

Tsiplakou, E.; Zervas, G (2008). The effect of dietary inclusion of olive tree leaves and grape marc on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk of dairy sheep and goats. *Journal of Dairy Research*, 75, 270–278.

Xynos, N.; Papaefstathiou, G.; Psychis, M.; Argyropoulou, A.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, A. L. (2012). Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 67, 89–93.

### **3.2 Manuscrito 2**

**COMPARISON OF EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF OLIVE  
LEAVES (*Olea europaea* L.) ASSISTED BY ULTRASOUND AND BY MACERATION**

**Será submetido à Revista Ultrasonic Sonochemistry**

(Configurado conforme as normas da revista)

## COMPARISON OF EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF OLIVE LEAVES (*Olea europaea* L.) ASSISTED BY ULTRASOUND AND BY MACERATION

### Abstract

The olive leaves are an agricultural by-product rich in phenolic compounds, whose extraction efficiency depends on the methodology employed. This study aimed to extract the phenolic compounds present in olive leaves by ultrasound assisted extraction using a solvent of low toxicity- ethanolic solution 60% (v/v), with citric acid 1 g L<sup>-1</sup>, using 40% amplitude and 20 kHz frequency probe and compared it with a traditional method (maceration). It were optimized the probe position (1 and 3 cm), temperature (20 °C, 40 °C and 60 °C) and time extraction (0.5 - 20 min). The effect of sonication (20 °C, 40 °C, and 60 °C during 2.5 min) was also analyzed. The results indicated that the use of olive leaves from Arbequina variety, at 20 °C, during 20 min of extraction recovery of 75.33% of phenol compounds (20.50 ± 0.26 mg GAE g<sup>-1</sup>), as compared to conventional method of extraction (maceration, 22 °C, 5 h; recovery of 27.32 ± 0.90 mg GAE g<sup>-1</sup>). The probe position did not have significant interference on the results and the effect of sonication was similar to the effect without the sonication, suggesting that the ultrasound promotes mainly agitation and there was no additive effect when compared to the traditional method.

**Keywords:** *Olea europaea* L., olive leaves, phenolic compounds, ultrasound assisted extraction, maceration.

## 1 Introduction

The changing of food preference for more healthy food has led the industry to invest in different products using natural compounds as an alternative to synthetic additives substances that have been linked to damage to health and the appearance of certain kinds of cancer [1, 2, 3, 4]. In the same way, there is today a trend to reuse the by-products generated by the industry in order to avoid the excessive amount of waste and also to use them as a source of substances with biological activity. An example of this is the olive leaves, which have been studied due to their rich chemical composition [5]. The olive (*Olea europaea* L.) is a characteristic Mediterranean tree, whose leaves are used during long years ago by local people in the form of teas to cure certain viral, fungal and bacterial diseases [6]. The leaves have a high content of phenolic compounds, which are the main substances responsible for biological activities [6]. Among these compounds, oleuropein and its derivative, hydroxytyrosol, are the substances present in the leaves with antioxidant activity ranging from 1% to 14% [7, 8]. Besides antioxidant activity, olive leaves extracts have shown other pharmacological properties, such as neuroprotective action [9]; antiviral activity [10, 11]; hypoglycemic [7]; hypotensive activity [12]; cardioprotective [13], and analgesic properties [14]. However, a challenge in the use of olive leaves is to find methods capable of extracting the substances present in olive leaves effectively and in the shortest time possible [3].

The traditional methods of extraction such as maceration, percolation and Soxhlet use a considerable amount of solvents, are time consuming and use a lot of energy [15, 16]. In order to overcome these drawbacks, the ultrasound-assisted extraction (UAE) has been used as an alternative to traditional methods to improve extraction [17], reducing the time of processing and amount of solvent leading to higher efficiency [18, 19, 20].

The heat generated by cavitation improves solubilization of substances, and the jets can disrupt plant cells, allowing the entrance of the solvent into the matrix and increasing the extraction efficiency [21]. The cavitation also causes turbulence and circulation in liquid causing an increase in the rate of mass transfer [16]. Considering the effects generated by ultrasound, some parameters must be analyzed before starting the extractions. The first is the type of equipment being used. The two most commonly used devices in the application of ultrasound are the bath and ultrasonic probe [21, 22]. The bath system is the most used in research, but is considered less effective for extraction because the sound energy is not spread evenly, which affects the repeatability and reproducibility of results [18, 21]. In contrast, probe has the advantage of transmitting energy in a specific region, which creates higher power, favoring the extraction processes [17, 18, 21]. Japón-Luján et al. [8] were the only authors analysed the extraction of phenolic compounds from olive leaves using ultrasonic probe. Other studies have found that using ultrasound bath system to extract phenolic compounds present in olive leaves were described by Skerget et al. [23], Cárcel et al. [24] and Sahin, Samli [5].

In order to obtain the best extraction performance, some parameters should be evaluated such as the time of irradiation amplitude, type of solvent and analyte to be extracted, as well as the sample-solvent ratio, extraction temperature and the depth at which the probe is positioned [25]. These parameters can affect the yield of the reactions, so it is important to optimize the extraction conditions.

Considering the potentiality of olive leaves to improve health and the need to find an appropriate method to extract their compounds, an extraction of phenolic compounds present in olive leaves grown in southern Brazil is proposed using UAE and the results were compared with traditional procedure of extraction. A high power probe was used and solvent



with low toxicity was used. The time, temperature, depth of probe were evaluated and the total content of phenolic compounds was determined.

## **2 Material and Methods**

### *2.1 Chemical and standards*

The following reagents were obtained from VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brazil) in analytical grade: citric acid monohydrate, sodium carbonate. Ethanol was obtained from Nova Química do Sul (Porto Alegre, RS, Brazil). Gallic acid was purchased from Sigma (St. Louis, MO., U.S.A.); Folin Ciocalteu Reactive was obtained from Proquímios (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Distilled water was used to prepare samples and standards.

### *2.2 Plant material and sampling*

Leaves of *O. europaea* L. variety Arbequina were harvest in Caçapava (Rio Grande do Sul- Brazil; latitude -30 ° 30' 44" and longitude -53 ° 29' 29") in the first week of August (winter) of 2011, from trees with four years old, and leaves of varieties Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki and Grappolo were harvest in Chapecó (Santa Catarina- Brazil; latitude -27 ° 05' 4" and longitude 52 ° 37' 06") in the second week of February (summer) of 2012, from trees with six years old. In order to obtain a uniform amount of leaves, the samples were collected from several trees and from different parts in order to minimize the effect of sun exposure and differences related to different maturation stages. The samples were dried using an oven with air circulation at  $45 \pm 5$  °C during 48 h. After, they were grounded in vertical rotor mill (Marconi, MA-340) and the powder was stored at - 20 °C, protected from direct light until further analysis.

### *2.3 Conventional extraction method*

For the purpose of comparison, the extraction was performed by sample agitation in ethanolic solution as described by Mylonaki et al. [26], with some modifications. Sample of olive leaves of variety Arbequina (0.5 g) was extracted with 20 mL of 60% (v/v) ethanolic solution (with 1 g L<sup>-1</sup> citric acid) in room temperature (22 ± 2 °C) with magnetic stirring (THELGA TMA 10C (MG, Brazil)) during 5 hours, under protection of the light. After extraction samples were filtered using a qualitative filter paper and stored at – 20 °C until the analysis. The extractions were carried out in triplicates. Considering that solvent evaporation could occur during extraction all extracts were filled after each extraction to the same final volume with alcoholic solution.

### *2.4 Ultrasound-assisted extraction*

For the experimental set up a 750 W, 20 kHz frequency ultrasonic probe was used (Sonics and Materials Inc., USA, 13 mm in diameter, 245 mm of length). The olive leaves of variety Arbequina (0.5 g) were placed in a stainless steel water-cooled reactor, containing 20 mL of 60% (v/v) ethanolic solution (with 1 g L<sup>-1</sup> citric acid) and after sonicated using different US parameters. Three main extraction parameters were examined in the following order: probe position (1 and 3 cm immersed into the liquid), sonication time (between 0.5 and 20 min) and sonication temperature (20 °C, 40 °C and 60 °C). The efficiency was evaluated based on one-step extraction by determination of total phenolic content. After extraction samples were filtered and placed into PE centrifuge tube (50 mL, conical bottom), stored at – 20 °C, and protected from direct light further analysis. Samples were analyzed in triplicates and recoveries were expressed as means plus standard deviation.

After determination of optimal conditions for extraction of phenolic compounds from Arbequina variety using ultrasound, the varieties Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki and Grappolo were evaluated. In order to demonstrate the effect of sonication on phenolic compounds extraction, tests were made using 20 °C, 40 °C and 60 °C, during 2.5 min, respectively, with and without ultrasound (with agitation), using Arbequina variety.

### *2.5 Determination of total phenolic content*

Total phenolic content of leaves was determined according to the Folin-Ciocalteu procedure reported by Singleton and Rossi [27]. Aliquots of 200 µL of extracts were diluted in the ratio 1:40 and were transferred to test tubes with the extraction solution, and were promptly added by 1000 µL of Folin-Ciocalteu solution diluted in the ratio 1:10. The tubes were stirred and allowed to stand by 8 min. Then, 800 µL of 7.5% (w/v) sodium carbonate solution was added. After stirring and stand for 2 h, the absorbance was read at 765 nm using a spectrophotometer (JENWAY UV- 6300 Jenway, UK) calibrated with reference solutions of gallic acid. The total phenol content was expressed as gallic acid equivalents in milligrams per gram of dried sample (mg GAE g<sup>-1</sup>).

### *2.6 Statistical analysis*

All experimental results were performed in triplicate and the data were expressed as mean ± standard deviation. The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and significant differences among means were determined by Tukey test at  $p < 0.05$  by Statistica software (StatSoft Inc, 7.0, Tulsa OK, USA, 2004).

### 3 Results and Discussion

#### 3.1 Extraction using conventional method

The extraction of phenolic compounds using a conventional method (maceration) resulted in a concentration equivalent to  $27.32 \pm 0.90$  mg GAE  $g^{-1}$ , extracted during 5 h, at 22 °C, with magnetic stirring. This concentration was considered as the highest phenol recovery and was used for comparison with the results obtained with the proposed extraction method.

#### 3.2 Ultrasound-assisted extraction

The influence of each parameter was evaluated separately, in univariate studies. The amplitude used in all experiments was based in some studies found in the literature, demonstrated that this parameter presented low influence on results [8, 28, 29]. Thus, the 40% of amplitude was chosen for performing all tests, since this is the lowest value which allows a uniform mixing and lowest sample projection. The highest phenolic compounds recovery was considered as optimal and was further used for optimization of other parameters.

The probe position was evaluated using 20 °C and 5 min of extraction. The results are showed in **Figure 1**, which demonstrates no statistical difference between the results obtained with different probe place (1 or 3 cm from the top of surface). These results are in agreement with those found by Japón-Luján et al. [8] who study the extraction of biophenols from olive leaves and also did not found differences between 0 to 4 cm of probe distance from the top of surface. Considering these results, 1 cm of distance of probe from the top of the liquid was used to carry out the following tests.

#### **Figure 1**

Temperature and extractions time were also evaluated and the results are described in **Figure 2**. When 20 °C was used, the statistical evaluation (ANOVA) suggested that phenol extraction yields are similar between 7.5 and 20 min, and, in this minimum time, the concentration of phenols was  $18.12 \pm 0.05$  mg GAE g<sup>-1</sup> and at 20 min of extraction the concentration reach  $20.50 \pm 0.26$  mg GAE g<sup>-1</sup>. At 40 °C, the maximum extraction was obtained from 7.5 min ( $20.75 \pm 0.89$  mg GAE g<sup>-1</sup>). The extractions performed at 60 °C had a maximum yield in 2.5 min ( $20.64 \pm 0.53$  mg GAE g<sup>-1</sup>). Although there was not statistical difference between the results using 40 °C and 60 °C compared to the result at 20 °C, during 20 minutes of extraction applying ultrasonic probe, the temperature of 20 °C was considered the best for extraction of phenolic compounds due to the possibility to work at room temperature that facilitates handling and avoids excessive energy consumption which it is necessary to maintain the system heated at higher temperatures. Moreover, the highest value found with the lowest standard deviations in the extraction using 20 °C was obtained with 20 min, although it was no statistic difference between the results found from 7.5 min. In this way, these conditions were used to extract phenolic compounds from other varieties, Arbosana, Negrinha do Freixó, Ascolano, Koroneiki and Grappolo, obtaining the following results: 21.80, 18.83; 18.15; 17.24 and 17.06 mg GAE g<sup>-1</sup>, respectively. The highest concentration was obtained from Arbosana variety that not differ from that found in the Arbequina variety, at the same extraction conditions. Japón-Luján et al. [8] found the maximum recovery of  $22.61 \pm 0.63$  g kg<sup>-1</sup>  $\pm$  standard deviations of oleuropein, using a mixture of ethanol-water (59:41 v/v), during 25 min of irradiation by ultrasonic probe positioned 4 cm from the top of the liquid, applying 30% amplitude, at 40 °C, value similar to those find in this study. Sahin and Samli [5] also studied the extraction of phenolic compounds from olive leaves cultivated in Turkey using an ultrasound bath, at 25 °C, during

25 min, with ethanolic solution 50% (v/v), obtained a phenolics compound concentration of 25.06 mg GAE g<sup>-1</sup>. Skerget et al. [23] also extracted the phenolic compounds from olive leaves with an ultrasonic bath at 40 °C, using pure methanol, during 120 min of sonication, obtaining a yield of 144 g GAE kg<sup>-1</sup> of extract. This result is different of the result found in our work, probably due the longer extraction time and the type of solvent, since it is know that the more polar is the solvent, more effective is the phenols extraction [30], and with the disadvantage that methanol is highly toxic.

## **Figure 2**

When it was compared the UAE efficiency with maceration (considered 100%), the extraction using Arbequina variety, at 20 °C, during 20 min has 75.3% of recovery. This value was considered close to the conventional procedure, and to obtain 100% of recovery probably it is necessary a re-extraction steps. The UAE is 15 times faster than the conventional extraction method (5 h) could be an important tool in obtaining phenolic compounds from plant sources [21, 22, 25, 29, and 32].

### *3.3 Effect of sonication*

The effect of sonication on extraction was evaluated using the same conditions previously described in UAE, with the difference that they were conducted without the aid of sonication. The temperatures evaluated were 20 °C, 40 °C and 60 °C at 2.5 min, respectively. The times were chosen because they were intermediate points, which reduce probable effects of temperature and stirring contributing to the maximum extraction points. The results indicate from **Figure 3** showed no statistical difference between the results when there is sonication and when there is no sonication. These results suggest that the effect of the

ultrasound is due to the agitation caused by the same, and no additional effect was observed when using the standard conditions in this study.

### **Figure 3**

## **4 Conclusion**

With this study it can be concluded that the olive leaves from Arbequina variety, grown in southern Brazil, have a significant amount of phenolic compounds, obtained during 5 h of extraction by maceration method. However, 75.33% of yield can be obtained by UAE extraction, using Arbequina variety at 20 °C, during 20 minutes of sonication, proving the efficiency of this device, caused mainly due to the stirring effect. The concentration of phenolic compounds was similar to that extracted from Arbosana variety in this same condition, demonstrating that these varieties cultivated in southern Brazil have considerable antioxidant content. Therefore, the proposed procedure could be considered as an effective and fast approach for phenol extraction using a solvent of low toxicity, contributing to reduction of pollution and also enabling reuse of an agricultural byproduct. However, it is suggested to carry out quantitative and qualitative studies about each type of phenolic extracted to make sure what treatment was the best, with subsequent extract application in food.

## **5 Acknowledgements**

Our thanks to all coworkers who cooperating to conduct this study, especially Matheus Rafael Raschen (*in memoriam*) and Carolina Corte Real (*in memoriam*). This research has been financed by CAPES, CNPq and UFSM.

## 6 References

- [1] Botsoglou, E.; Govaris, A.; Ambrosiadis, I.; Fletouris, D. Lipid and protein oxidation of  $\alpha$ -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea europea* L.) or  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *Meat Sci.* 92 (2012) 525–532.
- [2] Botsoglou, E.; Govaris, A.; Fletouris, D.; Botsoglou, N. Lipid oxidation of stored eggs enriched with very long chain fatty acids, as affected by dietary olive leaves (*Olea europea* L.) or  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation. *Food Chem.* 134 (2012) 1059–1068.
- [3] Brhami, F.; Mechri, B.; Dabbou, S.; Dhibi, M.; Hammami, M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Ind. Crop. Prod.* 38 (2012) 146–152.
- [4] Rodriguez-Rojo, S.; Visentin, A.; Maestri, D.; Cocero, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.* 109 (2012) 98–103.
- [5] Sahin, S.; Samli, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 595-602.



- [6] El, S. N.; Karakaya, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr. Revi.* 67 (11) (2009) 632-638.
- [7] Al-Azzawie, H. F.; Alhamdani, M. S. S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* 78 (2006) 1371 – 1377.
- [8] Japón-Luján, R; Luque-Rodríguez, J. M.; Luque de Castro, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chrom. A.* 1108 (2006) 76–82.
- [9] Mohagheghi, F.; Bigdeli, M. R.; Rasoulilian, B.; Hashemi, P.; Pour, M. R. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood–brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine.* 18 (2011) 170–175.
- [10] Lee-Huang, S.; Huang, P. L.; Zhang, D.; Lee, J. W.; Bao, J.; Sun, Y.; Chang, Y.; Zhang, J.; Huang, P. L. Discovery of Small-Molecule HIV-1 Fusion and Integrase Inhibitors Oleuropein and Hydroxytyrosol: I. Fusion Inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 354 (4) (2007) 872–878.
- [11] Yamada, K. et al. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antivir. Res.* 83 (2009) 35–44.

- [12] Susalit, E. Agus, N.; Effendi, I.; Tjandrawinata, R. R.; Nofiarny, D.; Perrinjaquet-Mocetti, T.; Verbruggen, M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18 (2011) 251–258.
- [13] Omar, S. H. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. J.* 18 (2010) 111–121.
- [14] Esmaeili-Mahani, S. et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010) 200–205.
- [15] Luque-Garcia, J.L.; Castro, M. D. L. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *J. Chrom. A.* 1034 (2004) 237–242.
- [16] Shirsath, S. R.; Sonawane, S. H.; Gogate, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chem. Engin. Proces.* 53 (2012) 10– 23.
- [17] Priego-Capote; Castro, L. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *Trends in Anal. Chem.* 23 (9) (2004) 645-653.
- [18] Chemat, F.; Zill-e-Huma; Khan, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 813–835.

- [19] Milic, P.S; Rajkovic, K.M.; Stamenkovic, O. S.; Veljkovic, V. B. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 525–534.
- [20] Vilku, K.; Mawson, R.; Simons, L.; Bates, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innov. Food Sci. and Emerg. Tech.* 9 (2008) 161–169.
- [21] Luque-Garcia, J.L; Castro, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for Leaching. *Trends in Anal. Chem.* 22, (1) (2003) 41-47.
- [22] Jerman, T.; Trebse, P.; Mozetic Vodopivec, B. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chem.* 123 (2010) 175–182.
- [23] Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A. R.; Simonic, M.; Knez, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 89 (2005) 191–198.
- [24] Cárcel, J. A.; García-Pérez, J. V.; Mulet, A.; Rodríguez, L.; Riera, E. Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves. *Phys. Procedia* 3 (2010) 147–152.

- [25] Herrera, M. C.; Castro, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J. Chrom. A.* 1100 (2005) 1–7.
- [26] Mylonaki, S.; Kiassos, E.; Makris, D.P.; Kefalas, P. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 977-985.
- [27] Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144-158.
- [28] Ávila, N. S.; Capote, F. P.; Castro, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *J. Chrom. A.* 1165 (2007) 158–165.
- [29] Ricárdez, O. F. M.; Jiménez, J.R.; Rivera, L. L.; Castro, M. D. L. Fast Ultrasound assisted Extraction of Polar (phenols) and Nonpolar (lipids) Fractions in *Heterotheca inuloides* Cass. *Phytochem. Anal.* 22 (2011) 484-491.
- [30] Kiritsakis, K.; Kontominas, M. G.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D.; Moustakas, A.; Kiritsakis, A. Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87 (2010) 369–376.

[31] Serradilla, J. A. P; Capote, F. P.; Castro, M. D. L. Simultaneous Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction of Polar and Nonpolar Compounds from Solid Plant Samples. *Anal. Chem.* 79 (2007) 6767-6774.

[32] Zhang, H-F., Yang, X-H.; Zhao, L-D.; Wang, Y. Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of Epimedium and extraction mechanism. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 10 (2009) 54–60.

7 Appendices

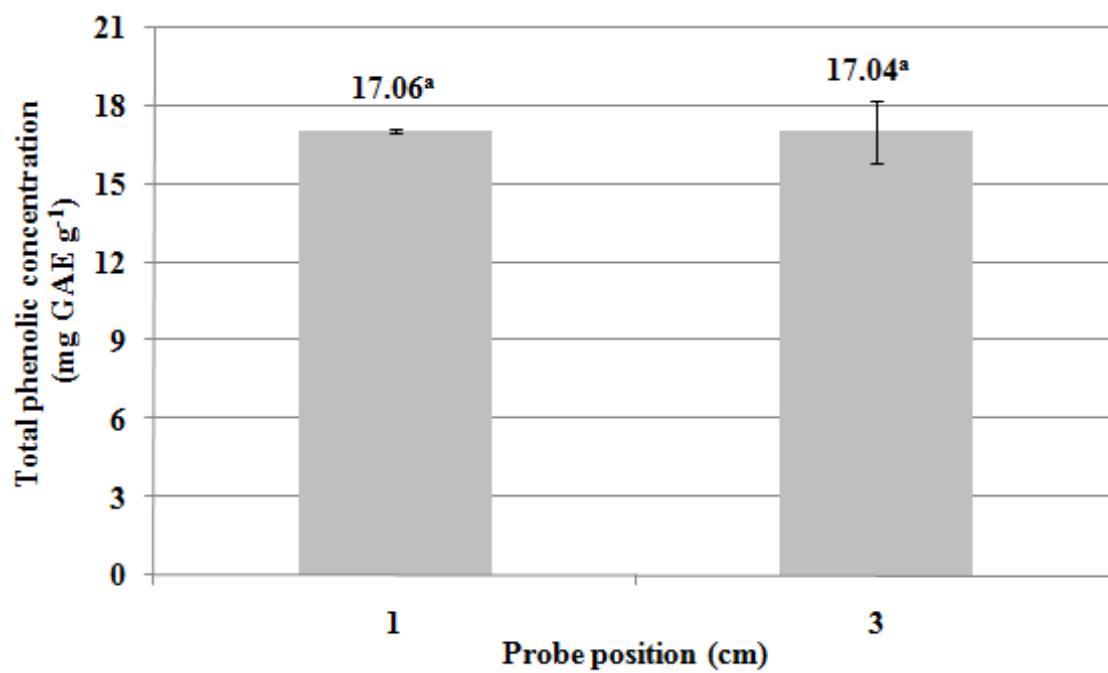


Fig. 1 Influence of probe position on the extraction of total phenolic compounds from olive leaves (n=3).

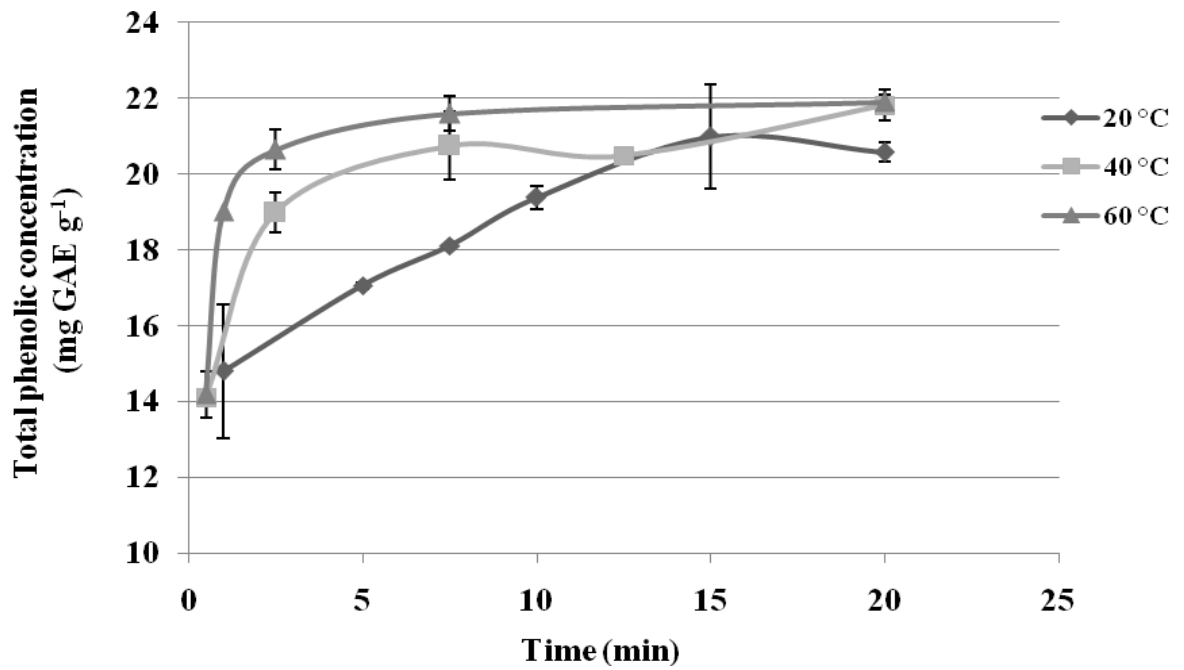


Fig. 2 Effect of time and temperature with UAE of total phenolic compounds from olive leaves (n=3).

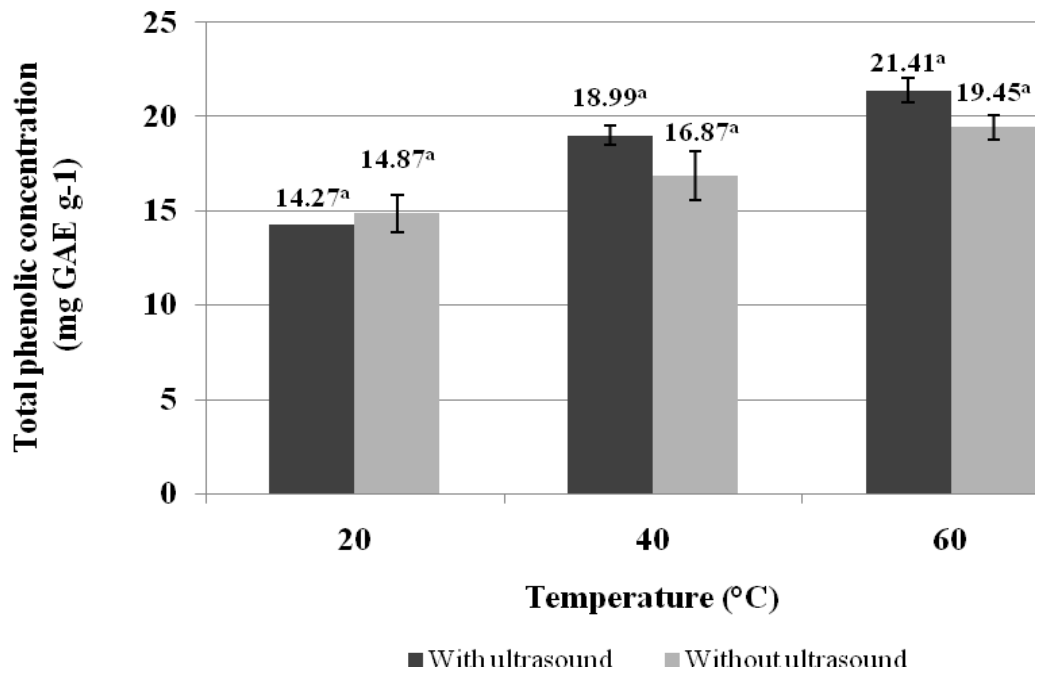


Fig. 3 Effect of sonication on the extraction of phenolic compounds from olive leaves (n=3) during 2.5 min of extraction



## 4 DISCUSSÃO

Através da análise da composição centesimal das diferentes variedades cultivadas no Sul do Brasil, pôde-se observar que as concentrações de lipídios totais, cinzas e proteína foram muito similares para todas as amostras, sendo que os valores foram superiores aos encontrados em alguns trabalhos descritos na literatura (BOUDHRIOUA et al., 2009; ERBAY, ICIER, 2009; MARTÍN-GARCÍA et al., 2003). Já quando se analisou a concentração de minerais, os resultados demonstraram variação dependendo do elemento e da variedade de oliveira analisada. Essa variação provavelmente pode ter ocorrido devido as diferentes necessidades de nutrientes ou pela fisiologia diferente de cada variedade, pois foram todas coletadas no mesmo local. Analisando do ponto de vista nutricional, as folhas de oliveira podem ser consideradas como fontes de Fe, Cu, Ca, Mg, Zn e Mn (100%; 200%, 50%, 30%; 15% e 55%, respectivamente, da quantidade recomendada a ser ingerida diariamente)

Outro dado importante que se pode observar através do primeiro artigo é a composição de ácidos graxos presentes nas folhas de oliveira. Todas as variedades apresentaram maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados, sendo que o encontrado em maior concentração foi o ácido linolênico, considerado como ácido graxo essencial. Isso indica que as folhas de oliveira podem ser um recurso de obtenção dos mesmos.

Outras substâncias estudadas que foram assunto discutido nos dois artigos são os compostos fenólicos. Os resultados obtidos demonstram que, com 5 h de extração, as concentrações de fenólicos entre todas as cultivares (Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki, Grappolo e Arbequina) variaram de 21,59 a 28,82 mg GAE g<sup>-1</sup>, sendo o valor mínimo obtido com o extrato da variedade Grappolo, e o máximo encontrado na variedade Arbosana. Esses resultados se mantiveram quando foram extraídos os compostos fenólicos de todas as variedades com auxílio do ultrassom (20 kHz, 20 °C, 20 min, sonda a 1 cm do topo da superfície), demonstrando a maior concentração para a variedade Arbosana e a menor para a variedade Grappolo. A variedade Arbequina também demonstrou altas concentrações de compostos fenólicos, não diferindo estatisticamente das concentrações encontradas na variedade Arbosana tanto para a extração com auxílio do ultrassom, quanto para a extração por maceração. Se for analisada a concentração de compostos fenólicos extraídos pelo método de maceração com base nas diferentes regiões de cultivo (Chapecó e

Caçapava) e estações do ano (verão e inverno), a concentração de compostos fenólicos totais não sofreu interferência desses parâmetros, visto que o resultado obtido com a variedade colhida em Caçapava (total de  $27,32 \pm 0,90$  mg GAE  $g^{-1}$ ) ficou entre os valores encontrados nas cinco variedades colhidas em Chapecó. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Papoti e Tsimidou (2009), que avaliaram a influência dos parâmetros de amostragem, como diferentes cultivares, idade das folhas e diferentes meses de colheita sobre a concentração de compostos fenólicos presentes em folhas de oliveira. Os autores concluíram que apesar de haver diferenças individuais na concentração dos fenóis (como oleuropeína e hidroxitirosol), essas concentrações não influenciaram no valor total de fenólicos obtidos, como também não afetaram na atividade antioxidante dos extratos, sugerindo que as folhas de oliveira são uma fonte robusta de fenólicos.

A utilização do método de extração proposto no segundo artigo, utilizando o ultrassom, com a sonda disposta a 1 cm do topo da superfície do líquido, com 20 mL de solução alcoólica 60% (v/v) adicionada de ácido cítrico  $1 g L^{-1}$ , a uma temperatura de  $20 ^\circ C$ , durante 20 min de extração, reduziu em 15 vezes o tempo necessário para a extração dos compostos fenólicos presentes nas diferentes cultivares de oliveira, quando comparado com a metodologia tradicional de extração (5 h). Além disso, o uso do ultrassom permitiu a recuperação de 73,3% dos compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira, quando comparado com a extração pelo método tradicional, valor esse que provavelmente poderia ser aumentado se outra etapa de re-extração fosse realizada.

Por fim, a análise de PCA permitiu discriminar as folhas das variedades cultivadas em Chapecó em dois grupos: um composto pela variedade Arbosana, relacionada com os maiores teores de compostos fenólicos e ácidos graxos saturados, e outro composto pelas demais variedades estudadas. Essa discriminação demonstra que a maior parte das variedades cultivadas no Sul do Brasil apresenta a composição química das folhas muito semelhante, e a escolha entre uma e outra vai depender da finalidade que a folha será empregada.

## 5 CONCLUSÕES

- As cinco variedades de oliveira estudadas apresentam uma concentração significativa de lipídios, composto por ácidos graxos mono e poli-insaturados, responsáveis em proporcionar ações benéficas á saúde.
- A maior concentração de compostos fenólicos foi obtida com os extratos da variedade Arbosana, por maceração, a qual também apresentou os maiores valores de lipídios, fenóis e ácidos graxos saturados, e os menores valores do ácido linolênico.
- A análise de PCA demonstrou uma separação das variedades em dois grupos com características distintas, devido ao teor de compostos fenólicos, ácidos graxos saturados e lipídios, sendo um composto pela variedade Arbosana, e o outro pelas outras quatro variedades (Ascolano, Negrinha do Freixó, Koroneiki e Grappolo).
- Foi desenvolvido um método de extração dos compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira utilizando o ultrassom, aplicando-se 40% de amplitude, 20 kHz de frequência, com a sonda disposta a 1 cm do topo da superfície do líquido, a 20 °C, durante 20 min. O rendimento obtido foi igual a 75,33%, quando comparado como método tradicional de extração, sendo 15 vezes mais rápido.
- O método proposto demonstrou-se eficaz e rápido na extração dos compostos fenólicos, principalmente devido ao efeito de agitação que o ultrassom ocasiona, com a vantagem de utilizar um solvente de baixa toxicidade.
- A realização de estudos quantitativos e qualitativos a respeito de cada tipo de composto fenólico extraído, assim como a aplicação subsequente dos extratos em alimentos podem ser indicadas como fonte de pesquisa para futuros trabalhos.

## REFERÊNCIAS

ABAZA, L.; YOUSSEF, N. B.; MANAI, H.; HADDADA, F. M.; METHENNI, K.; ZARROUK, M. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. **Grasas y Aceites**, v. 62, n. 1, p. 96-104, 2011.

ACHAT, S.; TOMAO, V.; MADANI, K.; CHIBANE, M.; ELMAATAOUI, M.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 777–786, 2012.

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66 (1), p. 1-9, 2007.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M.; FATHI, 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, n. 1, p. 38-47, 2011.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 838– 844, 2011.

ÁVILA, N. S.; CAPOTE, F. P.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 158–165, 2007.

BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. **El cultivo del olivo**. Madrid: Ediciones mundi-prensa y junta de Andalucía, 6<sup>a</sup> Ed. 2008. 846 p.

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

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; PICOLATO, R. S.; BARIN, J. S.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. **Analytical methods**, v. 2, p. 734-738, 2010.

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MÜLLER, E. I.; SCHIMIDT, L.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, v. 83, p. 324–1328, 2011.

BLIGH, E. G, DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOTSOGLOU, E.; GOVARIS, A.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N. Effect of dietary olive leaves and/or  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 121, p. 17–22, 2010.

BOUDHRIOUA, N.; BAHLOUL, N.; SLIMEN, I. B.; KECHAOU, N. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 412–419, 2009.

BRAHMI, F.; MECHRI, B.; DABBOU, S.; DHIBI, M.; HAMMAMI, M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p.146– 152, 2012.

CABALLERO, J. M. 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. 6. p. 159-192.

CANELA, M. R.; GONZÁLEZ, M. A. M. Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. **Maturitas**, v. 68, p. 245–250, 2011.

CÁRCEL, J.A.; PÉREZ, J. V. G.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 200–207, 2012.

CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; MULET, A.; RODRÍGUEZ, L.; RIERA, E. Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves. **Physics Procedia**, v. 3, p. 147–152, 2010.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383–2389, 2010.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Analytical applications of ultrasound. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 26, 413 p. 2007.

CASTRO, M.D.L., GARCIA-AYUSO, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analtica Chimica Acta**, n. 369, p. 1–10, 1998.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p.1189–1195, 2011.

CHATZISTATHIS, T.; THERIOS, I.; ALIGRAGIS, D.; DIMASSI, K. Effect of sampling time and soil type on Mn, Fe, Zn, Ca, Mg, K and P concentrations of olive (*Olea europaea L.*, cv. ‘Koroneiki’) leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 126, p. 291-296, 2010.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18 p. 813–835, 2011.

CONFAGRI, Confederação Nacional das Cooperativas Agrícolas e do Crédito Agrícola de Portugal. **Varietades existentes em Portugal**. Disponível em: < <http://www.confagri.pt>> Acesso em 20 mar. 2013.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H.; ARAÚJO, F.A. Mercados e comercialização. In: Coutinho, Ribeiro and Cappellaro (Org.). **Cultivo de oliveira (*Olea europaea L.*)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009, 102-115.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H.; ARAÚJO, F.A.; FARIA, M. A. R. Tratos culturais. In: COUTINHO, RIBEIRO e CAPPELLARO (Org.). **Sistemas de produção: cultivo de oliveira (*Olea europaea L.*)**. Pelotas: Embrapa, 2009b. p. 66-79.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. **Revista Oficial del Consejo Oleícola Internacional**, Madri: OLIVAE, n. 117, p. 1-72, 2012.

CRUZ, M. C. M.; OLIVEIRA, D. L.; OLIVEIRA, D. L.; CHALFUN, N. N. J. Botânica, anatomia e ecofisiologia. In: OLIVEIRA, A. F. (Org.). **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. cap. 5. p. 118-157.

DELGADO, P. et al. Effect of different drying systems for the conservation of olive leaves on their nutritive value for ruminants. **Annales de Zootechnie**, v. 47, p. 141–150, 1998.

DÍEZ, C. M.; TRUJILLO, I.; BARRIO, E.; BELAJ, A.; BARRANCO, C.; RALLO, L. Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. **Annals of Botany**, v. 108, n. 5, p. 797-807, 2011.

DIMITRIOS, B. Sources of natural Phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, p. 505–512, 2006.

EL, S. N.; KARAKAYA, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutrition Reviews**, n. 67, v.11, p. 632-638, 2009.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Imprensa: **Embrapa discute a Olivicultura**. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/24102012.php>> Acesso em 06 nov. 2012.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). **Cultivares**. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br>> Acesso em 20 mar. 2013.

EPAMIG, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Cultura da Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Circular Técnica, Belo Horizonte, n. 150, 7 p. 2002.

ERBAY, Z.; ICIER, F. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 533–541, 2009.

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

ESCLAPEZ, M. D.; PÉREZ, J.V.G.; MULET, A.; CÁRCEL, J.A. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p.108–120, 2011.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; MORENO, R.; GARCIA-CREUS, M. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Scientia Horticulturae*, v. 82, p. 25-45, 1999.

FERNANDEZ-HERNANDEZ, A.; MATEOS, R.; GARCIA-MESA, J. A.; BELTRAN, G.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. Determination of mineral elements in fresh olive fruits by

flame atomic spectrometry. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 8 (4), p. 1183-1190, 2010.

FLOCH, F. L.; TENA, M. T.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, v. 46, p. 1123–1130, 1998.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p. 1148–1155, 2010.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475-477, 1973.

HERRERO, M.; PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p. 2512–2520, 2010.

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

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.(b). 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.

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

JAPON-LUJAN, R.; CASTRO, M. D. L. Liquid–liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 2505–2511, 2008.

JERMAN, T.; TREBSE, P.; MOZETIC VODOPIVEC, B. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, v.123, p. 175–182, 2010.



KIRITSAKIS, K.; KONTOMINAS, M. G.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MOUSTAKAS, A.; KIRITSAKIS, A. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.87, n. 4, p. 369–376, 2010.

FARES, R.; BAZZI, S.; BAYDOUN, S. E.; ROULA, M.; MASSIH, A. The antioxidant and anti-proliferative activity of the lebanese *Olea europaea* extract. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 58-63, 2011.

LALAS, S.; ATHANASIADIS, V.; GORTZI, O.; BOUNITSI, M.; GIOVANOUDIS, I.; TSAKNIS, J.; BOGIATZIS, F. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1521-1525, 2011.

LEE, O.; Lee, B.; Lee, J.; Lee, H.; Son, J.; Park, C.; Shetty, K.; Kim, Y. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. **Bioresource Technology**, v.100, p. 6107–6113, 2009.

LI, C.; ZHENG, Y.; WANG, X.; FENG, S.; DI, D. Simultaneous separation and purification of flavonoids and oleuropein from *Olea europaea* L. (olive) leaves using macroporous resin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.15, p. 2826-2834, 2011.

LUQUE-GRACIA, J.L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, 2003.

MARTÍN GARCÍA, A. I.; MOUMEN, A.; YÁÑEZ RUIZ, D. R.; MOLINA ALCAIDE, E. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. **Animal Feed Science and Technology**, v.107, p.61–74, 2003.

MARTINS, F. P.; BARBOSA, S.; PINHEIRO, V.; MOURÃO, J. L.; MONTEIRO, D. O. The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. **Meat Science**, v. 82, p. 438–443, 2009.

MESTER, Z.; STURGEON, R. Sample preparation for trace element analysis, **Elsevier**, Amsterdam, 2003.

METHEREL, A. H.; TAHA, A. Y.; IZADI, H.; STARK, K. D. The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, p. 417–423, 2009.

MILIC, P. S.; Rajkovic, K. M.; Stamenkovic, O. S.; Veljkovic, V. B. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20 p.525–534, 2013.

MILINSK, M. C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V.; OLIVEIRA, C. C.; SOUZA, N. E. Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1475-1483, 2008.

MIRANDA, J. L. et al. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 284-294, 2010.

MOLINA-ALCAIDE, E.; YÁNEZ-RUIZ, D. R. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 247-264, 2008.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p.8– 18, 2011.

MYLONAKI, S.; KLIASSOS, E.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n. 392, p. 977-985, 2008.

OLISUL, Associação dos Olivicultores do Sul do Brasil. **Variedades de Oliveira. Mundo**. Disponível em: < <http://www.olivicultura-rs.com.br>> Acesso em 20/03/2012.

OLIVAE. **Revista Oficial del Consejo Oleícola Internacional**, n. 117, Madri, 2012.

OLIVEIRA, A. F.; ANTUNES, L. E. C.; SCHUCH, M. W. Caracterização morfológica de cultivares de oliveira em coleção e considerações sobre o seu cultivo no Brasil. **Informe Agropecuário**. Azeitona e Azeite de oliva: tecnologias de produção, Belo Horizonte, v. 27, n. 231, p. 55-62, 2006.

PACETTA, C. F. Estudos dos princípios ativos e composição físico-química das folhas da oliveira. In: OLIVEIRA, A. F. (Org.). **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. cap. 15. p. 481-495.

PAPOTI, V. T.; TSIMIDOU, M. Z. Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3470–3477, 2009.

PEREZ-JIMENEZ, F. et al. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 421–424, 2005.

PRIEGO-CAPOTE; CASTRO, L. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 645-653, 2004.

RAFIEE, Z.; JAFARI, S. M.; ALAMI, M.; KHOMEIRI, M. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 738-745, 2011.

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84– 98, 2012.

RIACHY, M. E. et al. Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 678–691, 2011.

RICÁRDEZ, O. F. M.; JIMÉNEZ, J.R.; RIVERA, L. L.; CASTRO, M. D. L. Fast ultrasound assisted extraction of polar (phenols) and nonpolar (lipids) fractions in *Heterotheca inuloides* Cass. **Phytochemical Analysis**, v 22, p. 484-491, 2011.

RODRIGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 98–103, 2012.

SAHAN, Y.; BASOGLU, F.; GUCER, S. ICP-MS analysis of a series of metals (namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 395–399, 2007.

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

SAHIN, S.; MEHMET, B.; UMUR, M. D. Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and Soxhlet methods. **Separation Science and Technology**, v. 46, n. 11, p. 1829-1837, 2011.

SERRADILLA, J. A. P; CAPOTE, F. P.; CASTRO, M. D. L. Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 6767-6774, 2007.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing**, v. 53, p.10– 23, 2012.

SILVA, S.; GOMES, L.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. **Food Science and Technology International**, v.12, n.5, p. 385–396, 2006.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191–198, 2005.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 323-331, 2010.

SOUZA, A. L.; COTRIM, M. E. B.; PIRES, M. A. F. An overview of spectrometric techniques and sample preparation for the determination of impurities in uranium nuclear fuel grade. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 194–201, 2013.

TAAMALI, 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**, v. 50, p. 1817–1825, 2012.

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

TROMBESI, A.; FARINELLI, D.; RUFFOLO, M.; SFORNA, S. First results of olive mechanical pruning. **Acta Horticulturae**, v. 949, p. 409-414, 2012.

TSIPLAKOU, E.; ZERVAS, G. The effect of dietary inclusion of olive tree leaves and grape marc on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk of dairy sheep and goats. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 270–278, 2008.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. **Food Chemistry**, v. 123, p. 905–911, 2010.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 161–169, 2008.

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. 1. p. 21-38.

XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; ARGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 89–93, 2012.