

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM GASTRONOMIA

Lucas Tolio Silva

**ENRIQUECIMENTO DE AZEITES DE OLIVA COM FOLHAS DE OLIVEIRA:**

Influência nas características físico-químicas, ácidos graxos livres, compostos fenólicos totais e tocoferóis.

Porto Alegre

2022

Lucas Tolio Silva

**ENRIQUECIMENTO DE AZEITES DE OLIVA COM FOLHAS DE OLIVEIRA:**  
Influência nas características físico-químicas, ácidos graxos livres, compostos  
fenólicos totais e tocoferóis.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Tecnólogo em Gastronomia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Garavaglia

Coorientadora: Me. Andressa Anelo Alvares

Porto Alegre

2022

© 2022

*Todos os direitos autorais reservados a Lucas Tolio Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.*

*Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245 - Centro Histórico, Porto Alegre - RS, 90050-170;*

*Fone: (51) 98300-1105;*

*Endereço Eletrônico: [lucasts@ufcspa.edu.br](mailto:lucasts@ufcspa.edu.br)*

Lucas Tolio Silva

**ENRIQUECIMENTO DE AZEITES DE OLIVA COM FOLHAS DE OLIVEIRA:**

Influência nas características físico-químicas, ácidos graxos livres, compostos fenólicos totais e tocoferóis.

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Tecnólogo em Gastronomia.

Data de aprovação: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ricardo Yudi Akiyosh – UFCSPA.

---

Me. Natália Cristina Averbuch – UFCSPA.

Porto Alegre

2022

*Para Eronita e Jones.*

## **Agradecimentos**

À minha mãe, Eronita, e meu pai, Jones, por todo amor, cuidado e apoio incondicional ao longo do curso e de toda minha vida.

Aos meus irmãos, Patrícia e Leonardo, e cunhado, Márcio, pela amizade e companheirismo.

Ao meu sobrinho, Maurício, por todo carinho.

A todos os meus amigos, meus sinceros agradecimentos.

À Rafaela e Andressa, pela amizade incondicional e incentivo nesta e em outras diversas etapas da minha vida.

À Tuane, Diego, Julia e Leonardo pela parceria, amizade, companheirismo e apoio desde o início do curso.

À Maria Eduarda, Liz, Andressa e Laura, pela presença constante e carinho que trouxeram para minha vida.

À toda equipe Patissier, pelo acolhimento, amizade e crescimento profissional.

Aos professores Isabel, Yudi e Luana, por todos os ensinamentos e amizade ao longo do curso.

Ao meus orientador Juliano, pela oportunidade de me orientar neste trabalho e em mais de três anos de iniciação científica, com muita paciência e impacto na minha vida acadêmica.

À minha coorientadora Andressa, pela parceria em mais de um projeto de pesquisa.

Às alunas bolsistas Luana e Dafne, e aos técnicos laboratoriais da Central Analítica, pelo auxílio nas análises físico-químicas.

À empresa Prosperato, pela doação dos azeites de oliva utilizados na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pelo ambiente acolhedor, estrutura e ensino que me proporcionou ao longo de minha formação.

*“You have to be who you are.*

*And I have to be who I am.*

*That's the way that it is.”*

— *Benjamin Alire Sáenz, Aristotle and Dante Discover the Secrets of the Universe.*

## RESUMO

O azeite de oliva vem atraindo cada vez mais consumidores ao redor do mundo, em função de suas múltiplas aplicações culinárias, presença de lipídios de boa qualidade e de compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes e estão relacionados a diversos efeitos benéficos à saúde. As folhas de oliveira são um subproduto da indústria do azeite, ricas em compostos fenólicos, ainda pouco exploradas, produzidas em grande quantidade e desperdiçadas. Já existem métodos efetivos para realizar o enriquecimento de azeites com folhas de oliveira, muitos deles de manejo simples e fácil, que podem aumentar a estabilidade do azeite de oliva e sua vida útil. Este trabalho é um estudo experimental com o objetivo de avaliar a influência do enriquecimento do azeite de oliva com as folhas da oliveira, em suas características físico-químicas, concentração de compostos fenólicos totais, alfa-tocoferóis e composição de ácidos graxos livres. Foram avaliados três azeites de oliva extra virgens produzidos no município de Barra do Ribeiro, RS, dois deles enriquecidos com folhas de oliveira pelo método de maceração em duas concentrações (1% e 3%, respectivamente) e posterior comparação com um azeite puro, da mesma safra. As amostras foram avaliadas em quatro tempos diferentes de armazenamento quanto à composição físico-química, compostos fenólicos totais, alfa-tocoferóis e composição de ácidos graxos. Os azeites enriquecidos com folhas de oliveira apresentaram quantidades significativamente superior de compostos fenólicos e alfa-tocoferóis em relação ao azeite de oliva extra virgem puro, além de resultados positivos na comparação entre os índices de peróxidos dos azeites, sendo esses os principais indicativas de oxidação nos azeites de oliva. Logo, uma maior estabilidade, resposta à oxidação e aumento de vida de prateleira foi observada nos azeites enriquecidos com as folhas de oliveira.

**Palavras-chave:** Azeite de oliva. Enriquecimento. Folha da oliveira. Compostos fenólicos. Estabilidade.

## ABSTRACT

Olive oil has been attracting more and more consumers around the world, due to its multiple culinary applications, the presence of good quality lipids and phenolic compounds, which act as antioxidants and are related to several beneficial health effects. Olive leaves are a by-product of the oil industry, rich in phenolic compounds, still little explored, produced in large quantities and wasted. There are already effective methods for enriching oils with olive leaves, many of them simple and easy to handle, which can increase the stability of the olive oil and its shelf life. This work is an experimental study with the objective of evaluating the influence of enrichment of olive oil with olive leaves, on their physicochemical characteristics, concentration of total phenolic compounds, alpha-tocopherols, and free fatty acid composition. Three extra virgin olive oils produced in the city of Barra do Ribeiro, RS, were evaluated, two of them enriched with olive leaves by the maceration method in two concentrations (1% and 3%, respectively) and subsequent comparison with a pure olive oil, from the same crop. The samples were evaluated at four different storage times for physicochemical composition, total phenolic compounds, alpha-tocopherols, and fatty acid composition. Olive oil enriched with olive leaves showed significantly higher amounts of phenolic compounds and alpha-tocopherols in relation to pure extra virgin olive oil, in addition to positive results in the comparison between the peroxides indices of the oils, which are the main indicators of oxidation in the olive oils. Therefore, greater stability, response to oxidation and increased shelf life was observed in oils enriched with olive leaves.

**Keywords:** Olive oil. Enrichment. Olive leaf. Phenolic compounds. Stability.

## Lista de Ilustrações

Figura 1: Oliveira.....	15
Figura 2: Composição Química Média do Fruto da Oliveira.....	18
Figura 3: Azeitona da cultivar Koroneiki.....	19
Figura 4: Fluxogramas de Extração de Azeite de Oliva, Pelos Métodos de Prensagem e Centrifugação.....	21
Figura 5: Concentração de compostos fenólicos totais das folhas, azeitona e azeite de oliva, em miligramas.....	26
Figura 6: Variação da Acidez Livre (%) das amostras de azeite de oliva.....	35
Figura 7: Variação do Índice de Peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg) das amostras de azeite de oliva.....	37
Figura 8: Variação de K232 das amostras de azeite de oliva.....	39
Figura 9: Variação de K270 das amostras de azeite de oliva.....	40
Figura 10: Variação da Concentração de Compostos Fenólicos Totais (mg/kg).....	42
Figura 11: Variação da Concentração de Alfa-tocoferol (mg/kg).....	43
Figura 12: Variação de ácido oleico das amostras de azeite de oliva.....	46
Figura 13: Variação de ácido palmítico das amostras de azeite de oliva.....	47
Figura 14: Variação de ácido linoleico das amostras de azeite de oliva.....	47

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Cultivo Mundial de Oliveiras em 2019. ....	16
Tabela 2: Área Cultivada com oliveiras no Rio Grande do Sul, em 2017. ....	17
Tabela 3: Classificação dos Azeites de Oliva, Segundo Padrões Internacionais. ....	22
Tabela 4: Composição centesimal de diferentes variedades de folhas de oliveira, em massa seca. ....	24
Tabela 5: Parâmetros de qualidade físico-químicas das amostras de azeite de oliva ao longo dos 12 meses de armazenamento. ....	34
Tabela 6: Concentração de Compostos Fenólicos Totais e Alfa-tocoferóis, em mg/kg, ao longo dos 12 meses de armazenamento. ....	41
Tabela 7: Composição de Ácidos Graxos Livres, ao longo dos 12 meses de armazenamento, em g/100g de óleo. ....	45

## Lista de Abreviaturas

SEAPDR – Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural.

RS – Rio Grande do Sul.

Ha – Hectares.

IOC – International Olive Council.

COI – Conselho Oleícola Internacional.

UE – União Europeia.

AOEV – Azeite de Oliva Extra Virgem.

AOV – Azeite de Oliva Virgem.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

C14:0 - Ácido mirístico.

C16:0 - Ácido palmítico.

C16:1 - Ácido palmitoleico.

C17:0 - Ácido heptadecanoico.

C17:1 - Ácido heptadecenoico.

C18:0 - Ácido esteárico.

C18:1 - Ácido oleico.

$\omega$ 9 - Ácido oleico.

C18:2 - Ácido linoleico.

$\omega$ 6 - Ácido linoleico.

C18:3 - Ácido  $\alpha$ -linolênico.

$\omega$ 3 - Ácido  $\alpha$ -linolênico.

C20:0 - Ácido araquídico.

C20:1 - Ácido gadoleico.

C22:0 - Ácido behênico.

C24:0 - Ácido lignocérico.

## Sumário

1	Introdução .....	12
2	Referencial Teórico .....	15
2.1	Oliveira.....	15
2.2	Azeitona .....	17
2.2.1	A Cultivar Koroneiki .....	18
2.3	Azeite de Oliva .....	19
2.3.1	Azeite de Oliva e Gastronomia .....	23
2.5	Folha da oliveira.....	24
3.	Justificativa.....	27
4.	Objetivos .....	28
4.1.	Objetivo Geral .....	28
4.2.	Objetivos Específicos.....	28
5	Metodologia.....	29
5.1	Análises Físico-químicas .....	30
5.1.1	Acidez Livre .....	30
5.1.2	Índice de peróxidos.....	30
5.1.3	Absorbância no Ultravioleta .....	31
5.1.4	Ácidos Graxos Livres .....	31
5.1.5	Compostos Fenólicos Totais.....	32
5.1.6	Tocoferóis .....	33
5.2	Análise estatística .....	33
6.	Resultados e Discussão .....	34
7	Conclusão .....	49
8	Referências .....	50

## 1 Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem, e devido aos benefícios que o consumo do azeite de oliva (óleo extraído da azeitona, que é o fruto da oliveira) proporciona à saúde humana, sua produção e consumo vêm crescendo nos últimos anos (1). No Brasil, o interesse pela cultura da oliveira está aumentando, pois existem diversas regiões com aptidão edafoclimática, como Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e especialmente o Rio Grande do Sul, que se destaca por ser o maior produtor de azeite de oliva do Brasil e por ter grande parte de seu território adequado à olivicultura (1,2). No Rio Grande do Sul, a cultura da oliveira foi introduzida oficialmente em 1948, através da criação do órgão especializado da Secretaria da Agricultura (Serviço Oleícola), com a finalidade de coordenar e orientar os trabalhos de fomento e pesquisa (1). Até então, o Brasil conhecia apenas a azeitona em conserva e o azeite em lata, que eram importados principalmente de Portugal, fator que foi determinante na formação dos hábitos de consumo do brasileiro em relação aos tipos de azeite e o seu desconhecimento acerca do produto. Além disso, devido a esta influência, o consumidor brasileiro tende a consumir azeites equilibrados (com poucas notas marcantes de picante e amargo, que são atributos sensoriais positivos em um azeite), com certa preferência pela cor verde, que é erroneamente associada a um azeite de melhor qualidade (3).

O azeite pode ser definido como uma mistura muito complexa, é composto quase em sua totalidade por gorduras, e de 1 a 3% por outros componentes, tais como compostos fenólicos, hidrocarbonetos, fosfatídeos, esteróis, vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), pigmentos (clorofila: cor verde; caroteno: cor amarela) e substâncias voláteis (4,5). Essa mistura de elementos confere ao azeite de oliva características únicas de sabor e aroma, contribuindo também para sua estabilidade (4,5). Um dos principais compostos presentes no azeite e na própria folha da oliveira é a oleuropeína, um potente antioxidante, reconhecido por apresentar diversas ações biológicas (anti-inflamatória, antitumoral, hepatoprotetora, antiaterosclerótica, antimicrobiana, antiviral, neuroprotetora) e podem ser utilizados como componentes de uma dieta normal para promover a saúde e prevenir doenças (6,7).

As folhas de oliveira são obtidas diretamente da planta da oliveira e podem ser consideradas um subproduto da indústria do azeite de oliva, produzidas em grande quantidade e desperdiçadas. As folhas são ricas em compostos fenólicos,

sendo o hidroxitirosol e a oleuropeína os principais, encontrados inclusive em quantidades significativamente superior nas folhas em relação aos azeites (8,9). Mas este subproduto ainda é pouco explorado, as folhas de oliveira são tradicionalmente cortadas durante a poda das plantas, mas não utilizadas, acabando como lixo biológico ou até alimentação animal (10).

A ingestão diária de compostos fenólicos através de azeites de oliva varia em função do tipo de azeitona, estágio de maturação, produção e extração de óleo, características agrônômicas, entre outros, mas uma boa estratégia para garantir a ingestão adequada de polifenóis seria produzir azeites de oliva virgens enriquecidos com estes compostos (6,10), visto que diferentes formas de substâncias ativas naturais podem ser utilizadas para enriquecer azeites de oliva, como folhas e bagaço da oliveira, ervas e especiarias(10). A exploração de folhas de oliveira como matéria-prima na produção de alimentos funcionais ou suplementos alimentares pode melhorar o gerenciamento de resíduos biológicos (10), além de possibilitar o desenvolvimento de azeites de oliva com propriedades funcionais, que poderiam ajudar na prevenção de doenças crônicas e melhorar a qualidade de vida dos consumidores (10,11), visto que este tipo de alimento pode promover um benefício adicional comparado a alimentos tradicionais, através de seus componentes naturais, que trazem benefícios à saúde (8).

Com relação as formas de enriquecimento dos azeites com as folhas de oliveira, a literatura já apresenta alguns métodos de obtenção do extrato das folhas, muitos deles de manejo simples e fácil, inclusive com excelentes resultados na quantidade final de compostos fenólicos, atividade antioxidante e com efeito de protetor contra a oxidação do azeite (9,12). Por outro lado, a suplementação com folhas de oliveira, além de aumentar a disponibilidade de compostos bioativos, pode aumentar a estabilidade do azeite de oliva e sua vida útil (8). Esse efeito tem um grande interesse pela indústria e o mercado consumidor, o qual poderá se beneficiar pelo consumo de azeites mais estáveis e com menores problemas de oxidação, processo que atua diminuindo a sua qualidade sensorial (10). O principal fenômeno ocasionado é o processo de rancinificação, o qual diminui a qualidade sensorial, pois ao azeite começa a apresentar notas sensoriais de gordura rançosa. A oxidação atua também na diminuição da quantidade de composto fenólicos, diminuindo assim, os benefícios do consumo de compostos bioativos (10).

Diversos estudos vêm evidenciando os efeitos que uma dieta rica compostos fenólicos oriundos do azeite extra virgem enriquecido com folhas de oliveira trazem benefícios para a saúde humana, incluindo atividade cardioprotetora, onde o hidroxitirosol (um dos compostos fenólicos mais abundantes no azeite extra virgem e em folhas de oliveira) exerce ação antioxidante, anti-inflamatória, antiplaquetária e antiaterogênicas, sendo inclusive capaz de exercer atividades reguladoras de genes associados à aterogênese (13).

Estabelecidas por legislação específica de cada país e por padrões internacionais definidos (14–16), os azeites de oliva produzidos no Brasil possuem índices de acidez em ácido oleico, peróxidos e refração absoluta de acordo com a resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (17) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (18), podendo ser inicialmente classificados como azeites de oliva extra virgem ou virgem, e de modo geral, todos os ácidos graxos presentes nos azeites possuem valores satisfatórios, com maior concentração de ácido oleico, principal ácido responsável pelos benefícios à saúde (4,5). Para ser considerado extra virgem, o azeite de oliva deve possuir uma série de critérios de qualidade. Esta classificação é concedida de acordo com suas características de composição (análise físico-química) e a avaliação sensorial realizada por um painel treinado (16,19). O método de análise sensorial deve ser aplicável à avaliação da característica e atributos sensoriais do azeite de oliva, tal como reconhecido pelo órgão responsável e de fiscalização, sendo que, a avaliação deverá ser realizada por um grupo de provadores selecionados e treinados como um painel sensorial (19,20).

## 2 Referencial Teórico

### 2.1 Oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma angiospérmica dicotiledónea, árvore frutífera pertencente à família botânica *Oleaceae*, cuja maioria das espécies é representada por árvores e arbustos (21). As espécies de plantas dessa família estão distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas do mundo, com aproximadamente 35 espécies do gênero *Olea*, sendo a *Olea europaea* L. a única espécie da família *Oleaceae* com frutos comestíveis. (21,22)

Figura 1: Oliveira.



Fonte: <https://hmjardins.com.br/oliveira-oportunidade-negocio/oliveira-adulta1/>

A origem exata da oliveira não é precisa, mas há evidências na literatura que seu descobrimento remonta há mais de 6.000 anos, sendo uma das árvores frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem (21–24). A sua origem se deu na região geográfica que ocupa o sul do Cáucaso até o planalto do Irã, Palestina e a zona costeira da Síria, estendendo-se até o Egito (22). A domesticação da oliveira teve início no período Paleolítico e Neolítico, entre 10000 e 3000 a.C, possivelmente na Mesopotâmia, de onde foi difundida para o Egito, em 2000 a.C., e ilhas da Ásia Menor e Grécia Continental, em 1800 a.C (22). Posteriormente, a presença da oliveira foi disseminada por toda a bacia do mar Mediterrâneo, espalhando-se pela Europa e pelo Oriente Médio (23).

Com as Grandes Navegações e a descoberta do Mundo Novo, no século XV, a oliveira ultrapassou as fronteiras do mar Mediterrâneo e difundiu-se pela América, onde começou a ser cultivada, a partir do século XVI, em países como México, Peru, Jamaica, Estados Unidos, Chile e Argentina (24). Posteriormente, olivais foram

cultivados em países como África do Sul, Austrália, Japão, China, Uruguai e Brasil (22).

No Brasil, a olivicultura foi introduzida pelos portugueses no início do século 19, em diversas regiões do sul e sudeste do país, principalmente nos atuais estados de Minas Geras, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (22,23). No Rio Grande do Sul, a cultura da oliveira foi introduzida oficialmente em 1948, através da criação do Serviço Oleícola, órgão criado pela Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR), com a finalidade de superintender e orientar os trabalhos de fomento e pesquisa (21,25).

A superfície territorial mundial cultivada com oliveiras cresceu muito nas últimas décadas, quase quadruplicando nos últimos 50 anos (26). A concentração das áreas produtoras está entre as latitudes 30° e 45° nos hemisférios Norte e Sul, essas regiões têm como características o verão quente e seco, e baixas temperaturas no inverno (24). Até 2019, registrou-se um total de 11.519,601 hectares dedicados à plantação e cultivo da oliveira. A **tabela 1** mostra a área total nos diferentes países produtores. A Europa é responsável por 54% dessa produção, onde encontram-se os maiores produtores de oliveira: em primeiro lugar a Espanha, seguida por Itália e Grécia (23,27).

Tabela 1: Cultivo Mundial de Oliveiras em 2019.

Continentes	Produção Total		Mesa		Azeite	
	Hectares	%	Hectares	%	Hectares	%
África	3.503.030	30,41	492.881	30,86	3.010.149	30,34
América	325.019	2,82	121.555	7,61	203.464	2,05
Ásia	1.428.703	12,40	296.305	18,55	1.132.397	11,41
Europa	6.220.197	54,00	685.215	42,90	5.534.982	55,78
Oceania	42.653	0,37	1.305	0,08	41.347	0,42
Total	11.519.601	100	1.597.262	13,87	9.922.339	86,13

Fonte: Urieta et al., 2019.

No Rio Grande do Sul, conforme dados publicados pelo Cadastro Olivícola de 2017, existem 56 municípios produtores registrados no estado, pertencendo em sua grande maioria às regiões gaúchas com as maiores áreas de plantio (**tabela 2**), dentre essas regiões existem oito unidades fabris no Rio Grande do Sul, produzindo

cerca de 58 mil litros por ano, distribuídos em 20 marcas comerciais de azeites de oliva (28,29).

Tabela 2: Área Cultivada com oliveiras no Rio Grande do Sul, em 2017.

Região	Área (Ha)	%
Serra do Sudeste	1.778,5	51,3
Campanha	599,7	17,3
Depressão Central	453	13,1
Metropolitana	422,4	12,2
Serra Nordeste	146	4,2
Norte	65	1,9
Total	3.464,6	100

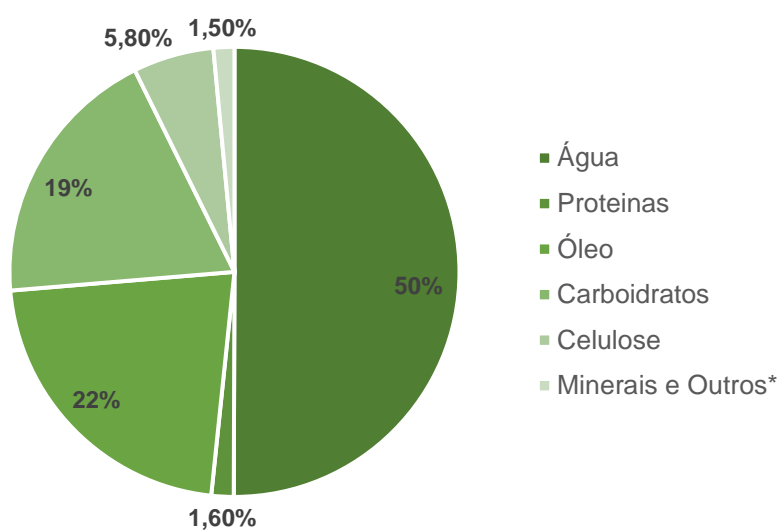
Fonte: Lipp et al., 2017.

## 2.2 Azeitona

O fruto da oliveira (*Olea europaea L.*) é denominado azeitona, considerada uma drupa, ou seja, um fruto de caroço único, coloração que vai de verde a preta, passando por tonalidades de verde-palha a arroxeadas (4,22). Possui tamanho pequeno e dimensões que podem variar entre 2 e 12 gramas, 1 e 4cm de comprimento e 0,6 a 2cm de diâmetro em função de fatores intrínsecos-genéticos, e extrínsecos, como clima, relevo, temperatura, umidade etc. (4,22).

A azeitona é constituída por pericarpo e endocarpo, onde o primeiro representa cerca de 65-83% do peso total do fruto, sendo coberto com uma camada de cera e dividindo-se em duas partes: o epicarpo (pele) e o mesocarpo (carne, polpa) (4). O endocarpo é constituído pelo caroço do fruto (4). A **figura 2** mostra a composição química básica do fruto da oliveira.

Figura 2: Composição Química Média do Fruto da Oliveira.



1

Fonte: Boskou D, 2006.

A variabilidade genética representa a diversidade de tipo de cultivares de azeitonas produzidos pelas oliveiras (4,30). Os principais cultivares de azeitonas são: Arbequina, Picual, Koroneiki, Frantoio, Arbosana, Galega, Ascolana, Cordovil de Serpa (Penafiel), Manzanilla de Sevilla, Hojiblanca (4,30). Estima-se que 86,13% da produção mundial de azeitona é destinada à produção de azeite de oliva, sendo o restante destinado às azeitonas de mesa (23).

### 2.2.1 A Cultivar Koroneiki

A azeitona da varietal Koroneiki é originária da Grécia, e ocupa cerca de 60% da área de plantio do país, podendo chegar a 85% na ilha de Creta (31). Ela é resistente a climas mais secos, mas não suporta muito frio (31,32). O fruto é pequeno e possui formato ovoide, com média de 1,07 gramas (**figura 3**), e possui uma maturação geralmente precoce (33). A produtividade de azeite produzido a partir da varietal é relativamente alta, com cerca de 2.092kg de azeite produzidos por hectare plantado do fruto (31–33). O azeite de oliva extraído dessa cultivar possui estabilidade elevada em comparação as demais cultivares, em virtude da alta concentração de ácido oleico (31,32).

<sup>1</sup> \*Pectinas, ácidos orgânicos, pigmentos e glicosídeos de fenóis.

Figura 3: Azeitona da cultivar Koroneiki.



Foto: Enilton Fick Coutinho

### 2.3 Azeite de Oliva

O azeite de oliva é o óleo obtido somente a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*) unicamente por meio de processos mecânicos ou outros meios físicos, sob controle de temperatura adequada a fim de manter a natureza original do produto (14–16,18). Ele é o óleo comestível mais antigo e possui um grande valor nutricional, sociocultural e econômico (34). Seu consumo tem aumentado significativamente nas últimas décadas, devido à sua grande relação com os benefícios para a saúde e suas características sensoriais e físico-químicas, resultantes da sua composição, sendo estas as principais responsáveis pela qualidade do azeite (34).

O azeite de oliva é a principal fonte de ingestão de gordura da dieta mediterrânea (7,35). Ele contém uma grande proporção de gordura monoinsaturada, é relativamente pobre em gordura saturada e é uma fonte de antioxidantes, tais como, vitamina E, fitosteróis, carotenoides e compostos fenólicos (7).

A composição química do azeite de oliva é dividida entre a fração saponificável e a fração insaponificável (4,5). A fração saponificável (insolúvel em água) constitui cerca de 98% do azeite e é constituída essencialmente pelos triacilgliceróis, uma pequena fração de ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos, sendo o mais abundante o ácido oleico (ômega 9), com uma fração que corresponde de 55 à 85% do total de ácidos graxos presentes no azeite de oliva (4,5).

Já a fração insaponificável (solúvel em água) é formada por uma série de compostos variados, tais como, álcoois alifáticos, ceras, hidrocarbonetos, pigmentos, compostos fenólicos, fitosteróis e tocoferóis, que garantem diversas funções como a estabilidade do azeite e as características sensoriais (4,5). Os compostos fenólicos, por sua vez, são subdivididos em secoiridoides (oleuropeína), álcoois fenólicos (hidroxitirosol), flavonoides e ligninas (4).

Em 1959, na Espanha, foi criado o International Olive Council (IOC), em português, denominado Conselho Oleícola Internacional (COI), uma organização intergovernamental e internacional criada para representar todos os países que, dentro da instituição, produzem azeitona e azeite de oliva, responsável por estipular parâmetros para segmentos de produção, definições de normas de qualidade, vigilância e autenticidade (36). O Conselho é um ator decisivo na contribuição para o desenvolvimento sustentável e responsável da olivicultura e funciona como um fórum mundial para discutir questões de formulação de políticas e enfrentar desafios presentes e futuros (36) .

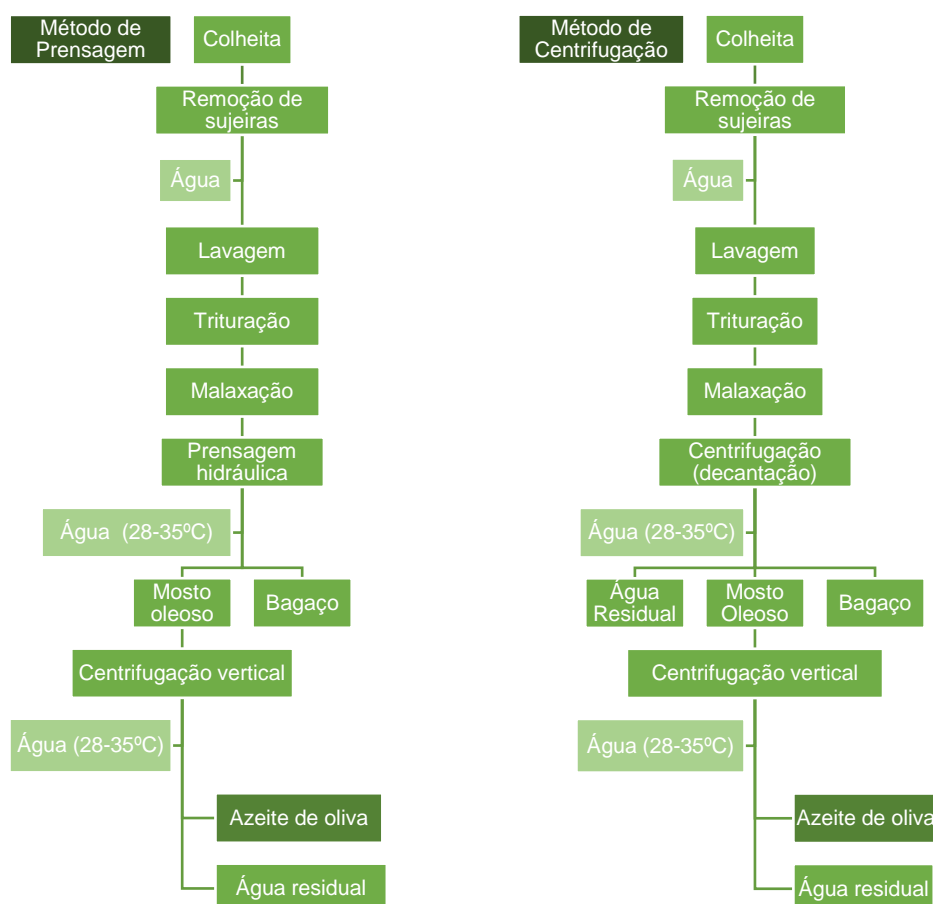
Segundo padrões de qualidade internacionais propostos pela União Europeia, o IOC e o *Codex Alimentarius*, o azeite de oliva é classificado em algumas categorias comerciais, de acordo com sua qualidade, em Azeite de Oliva Extra Virgem, Azeite de Oliva Virgem, Azeite de Oliva Lampante, Azeite de Oliva Refinado, Azeite de Oliva Composto e Azeite de Bagaço de Azeitona (14–16).

O azeite de oliva extra virgem (AOEV) e o azeite de oliva virgem (AOV) são os azeites de maior qualidade e devem ser destinados ao consumo humano sem alterações, tendo suas classificações descritas através de parâmetros de qualidade pré-estabelecidos, como descrito na **tabela 3** (14–16). O azeite de oliva lampante é aquele com pior qualidade e parâmetros insuficientes para serem destinados ao consumo humano, apenas após processo de refino (14–16). O azeite refinado é fruto de um azeite de oliva lampante e pode ser comercializado puro ou como um azeite composto, quando é misturado com AOEV ou AOV (14–16). O Azeite de Bagaço de azeitona é o óleo obtido por tratamento de bagaço de azeitona com solventes ou outros tratamentos físicos, que também pode ser refinado e comercializado como composto (14–16).

No Brasil, os padrões de qualidade e classificação dos azeites de oliva são avaliados segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC 270/200523 (17) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 1, de 30 de janeiro de 2012 (18) e baseados em parâmetros internacionais, conforme dados da **tabela 3** (14–16).

O fluxograma de extração do azeite de oliva compreende quatro operações principais: limpeza dos frutos; preparação da pasta; separação das fases sólida (bagaço) e líquida (mosto oleoso e águas residuais); e separação das fases líquidas (óleo/águas residuais) (4). Existem dois métodos para a extração do azeite, ambos livres de solventes (**figura 4**) (4). O primeiro método baseia-se na prensagem mecânica da matriz de azeitonas obtida em moinho de pedra, já no segundo, há uma centrifugação com separação trifásica da matriz de azeitonas obtida em moinho de martelo (4).

Figura 4: Fluxogramas de Extração de Azeite de Oliva, Pelos Métodos de Prensagem e Centrifugação.



Fonte: Boskou D, 2006.

Tabela 3: Classificação dos Azeites de Oliva, Segundo Padrões Internacionais.

Parâmetro	Classificação		
	Extra Virgem	Virgem	Lampante
Acidez livre (%)	≤ 0,80	≤ 2,00	> 3,30
Índice de peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg)	≤ 20,0	≤ 20,0	*
K 232	≤ 2,50	≤ 2,60	*
K 270	≤ 0,22	≤ 0,25	*
ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	*
Ácido mirístico (C14:0)	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03
Ácido palmítico (C16:0)	7,50 a 20,00	7,50 a 20,00	7,50 a 20,00
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,30 a 3,50	0,30 a 3,50	0,30 a 3,50
Ácido heptadecanoico (C17:0)	≤ 0,04	≤ 0,04	≤ 0,04
Ácido heptadecenoico (C17:1)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06
Ácido esteárico (C18:0)	0,50 a 5,00	0,50 a 5,00	0,50 a 5,00
Ácido oleico/ω9 (C18:1)	55,00 a 83,00	55,00 a 83,00	55,00 a 83,00
Ácido linoleico/ω6 (C18:2)	2,50 a 21,00	2,50 a 21,00	2,50 a 21,00
Ácido α-linolênico/ω3 (C18:3)	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00
Ácido araquídico (C20:0)	≤ 0,60	≤ 0,60	≤ 0,60
Ácido gadoleico (C20:1)	≤ 0,50	≤ 0,50	≤ 0,50
Ácido behênico (C22:0)	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20
Ácido lignocérico (C24:0)	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20
C18:1 t	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10
C18:2 t + C18:3 t	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10
Colesterol (% esteróis totais)	≤ 0,50	≤ 0,50	≤ 0,50
Brassicasterol (% esteróis totais)	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,10
Campesterol (% esteróis totais)	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0
Estigmasterol (% esteróis totais)	< campesterol	< campesterol	< campesterol
Δ-7-estigmastenol (% esteróis totais)	≤ 0,50	≤ 0,50	≤ 0,50
β-sitosterol (% esteróis totais)	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0
Esteróis totais (mg/kg)	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Eritrodiol e Uvaol (% esteróis totais)	≤ 4,50	≤ 4,50	≤ 4,50
Ceras (mg/kg)	≤ 150	≤ 150	≤ 300
Diferença do ECN 42 (%)	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30
Estigmastadienos (mg/kg)	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,50

Fonte: International Olive Council, 2019.; European Union, 2013; Codex Alimentarius, 2021.

### 2.3.1 Azeite de Oliva e Gastronomia

Nos últimos 30 anos, tem havido um interesse crescente na utilização do azeite de oliva na culinária devido a uma maior sensibilização para a comida mediterrânea e às virtudes saudáveis desta dieta (37,38). O uso da gordura crua adicionada aos alimentos após o cozimento é a melhor maneira de expressar o sabor original e maximizar a ingestão de antioxidantes naturais e compostos associados a efeitos positivos na saúde humana (39). Mesmo durante o cozimento, o azeite de oliva ainda exibe fortes propriedades antioxidantes e influencia o sabor geral dos alimentos cozidos (39). Os fenômenos químicos e físicos que ocorrem quando o azeite é cozido com outros ingredientes alimentares envolve alterações nas qualidades sensoriais e nutricionais de alguns alimentos (39).

A determinação da metodologia de avaliação sensorial, designada por um painel sensorial treinado (20), tem origem em várias orientações e instruções relativas à degustação de azeites definidas pelo International Olive Council (19,40). Com base na detecção de determinados atributos negativos, como ranço, avinagrado, mofo, etc., bem como na medição da intensidade de três atributos positivos (frutado, amargo e picante), o painel sensorial conduz à “classificação” do azeite do ponto de vista sensorial (40). As amostras que apresentam uma mediana de defeitos não superior a zero ( $= 0$ ) e uma mediana de frutado superior a zero ( $> 0$ ) são categorizadas como azeites de oliva extra virgem, que representa o nível de classificação mais alto que um azeite pode alcançar (14–19).

No comércio nacional e internacional de azeites de oliva, percebe-se que no nível de classificação “extra virgem” (ou seja, dentro de uma mesma categoria) uma ampla gama de azeites sensorialmente diferentes é agrupada na mesma categoria (41). A razão é que é suficiente cumprir os requisitos mínimos mencionados acima para tal classificação, ou seja, sem considerar diversos outros atributos sensoriais dos azeites (19,41).

Após a colheita da azeitona e durante o armazenamento do azeite de oliva, o óleo começa a passar pelo processo de oxidação, sendo a principal forma de deterioração dos óleos, que ocorre quando o oxigênio atmosférico se dissolve no óleo e reage com seus componentes (42). Essa oxidação é responsável pela deterioração das características sensoriais do azeite, ou seja, diminuição das

características sensoriais positivas e aumento das características negativas (42). As ações antioxidantes dos azeites, em virtude da composição química e presença de compostos fenólicos e antioxidantes auxiliam no aumento de vida de prateleira do produto, com maior estabilidade de atributos sensoriais (42).

## 2.5 Folha da oliveira

As folhas das oliveiras são consideradas como subproduto ou rejeito de produção, visto que não são utilizadas na produção dos azeites (43–45). As indústrias geram altos volumes de folhas que não são aproveitadas como agentes tecnológicos, gastronômicos ou farmacêuticos, apenas direcionadas como lixo biológico ou até alimentação animal (43–45). Entretanto, existe um crescente interesse no uso e aplicação das folhas da oliveira para aproveitamento de seus compostos bioativos na área da saúde, como prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (46–48), agente antibacteriano (49), aditivo natural, e na indústria de alimentos e gastronomia (50–53).

A **tabela 4** representa a composição centesimal de diferentes variedades de folhas de oliveira. A composição da varietal Arbequina foi realizada a partir de folhas cultivadas no município de Caçapava do Sul (RS) (54), enquanto as variedades Chemlali, Chetoui, Chemchali e Zerrazi foram produzidas a partir de folhas cultivadas na Tunísia (55).

Tabela 4: Composição centesimal de diferentes variedades de folhas de oliveira, em massa seca.

Variedade	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios	Carboidratos Totais
Arbequina	58,68±0,07	4,38±0,18	12,24±0,23	8,14±0,24	19,56±0,38
Chemlali	49,75±0,64	4,45±0,20	7,61±0,27	1,05±0,11	37,14±0,73
Chetoui	48,18±0,34	2,97±0,02	5,04±0,15	1,23±0,21	42,58±0,43
Chemchali	49,50±0,94	2,90±0,05	6,68±0,28	1,16±0,24	39,76±0,99
Zerrazi	46,24±0,54	2,86±0,10	7,10±0,23	1,30±0,18	42,50±0,62

Resultados expressos como média e desvio padrão (%), n=3.

Fonte: Cavalheiro et al., 2014; Boudhrioua et al., 2009.

As folhas de oliveira, de maneira geral, são ricas em compostos fenólicos com alto potencial antioxidante (56–59). Os compostos fenólicos mais abundantes presentes nas folhas são verbascosídeo, apigenina-7-glicosídeo, luteolina-7-

glicosídeo, hidroxitirosol (HT), tirosol e o secoiridoide oleuropeína, sendo os secoiridoídes presentes exclusivamente em plantas da família *Oleaceae* (60).

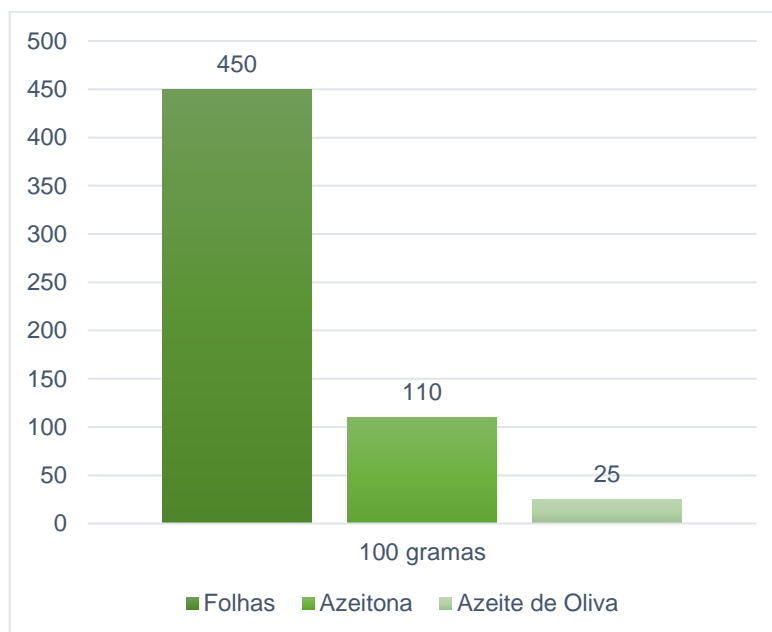
Em virtude da concentração de compostos fenólicos, as folhas das oliveiras possuem alta percepção sensorial de amargor e adstringência (61). O sabor amargo e a sensação tátil de adstringência são provocados principalmente pelos flavonoides fenóis, incluindo flavonoides e flavonóis (62). Estudos e experimentos que utilizam o extrato da folha da oliveira são fortemente limitados na indústria em virtude dessas características (61).

Diversos ensaios clínicos randomizados têm analisado os efeitos do extrato da folha de oliveira sobre fatores de risco cardiometabólicos em adultos (63–74). Os extratos possuem concentrações de Oleuropeína e Hidroxotirosol que variaram entre 19,9 e 200 mg e 6,4 a 9,7 mg diários, respectivamente (63–74). Os ensaios possuem efeitos positivos nos desfechos de diminuição da pressão arterial (64,74), perfil lipídico (67,74), metabolismos de glicose (66,68,69,72,73) e marcadores inflamatórios (63,74). Nenhum ensaio determinou efeitos negativos e colaterais acerca do uso dos extratos das folhas em humanos (63–74).

O principal componente ativo da folha de oliveira é a oleuropeína, um composto fenólico natural do grupo secoiridoídes (60). A oleuropeína possui amplas propriedades para sua utilização em medicamentos farmacológicos e promotores de saúde, incluindo efeitos antiarrítmicos, espasmo líticas, imunoestimulantes, cardioprotetores, hipotensores, anti-inflamatórios, antioxidantes etc. (75,76).

A concentração dos compostos fenólicos encontrados nas folhas da oliveira é significativamente superior aos encontrados na azeitona e no próprio azeite (77–79). Conforme a **figura 5**, a folha contém 4 vezes mais conteúdo fenólico que o fruto, e 18 vezes mais que o azeite (77–79). Estudos tem demonstrado o efeito protetor na vida de prateleira de diversos produtos alimentícios enriquecidos com a folha da oliveira, como extrato de tomate (80), linguiças (81), carnes (82) etc. pela ação antioxidante de seus compostos fenólicos.

Figura 5: Concentração de compostos fenólicos totais das folhas, azeitona e azeite de oliva, em miligramas.



Fonte: Silva et al., 2006; Kountouri et al., 2007; Owen et al., 2000.

### 3. Justificativa

O consumo de azeite de oliva tem apresentado um aumento significativo nas últimas décadas, em virtude tanto de sua versatilidade gastronômica, quanto de sua composição físico-química, rica em ácidos graxos monoinsaturados e compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes. Esse consumo relaciona-se com diversos benefícios à saúde humana.

O Brasil é o terceiro maior consumidor mundial de azeite de oliva. A região da Serra da Mantiqueira, no estado de Minas Gerais, destaca-se pelas condições climáticas favoráveis e pela boa adaptação da oliveira, assim como o estado do Rio Grande do Sul, sendo ambos estados os maiores produtores de azeite de oliva do país. O Brasil tem possibilidade de tornar-se, cada vez mais, um grande produtor de azeitonas de mesa e de azeite de oliva de qualidade de azeite extra virgem, com participação no mercado nacional e internacional. Isso enriqueceria a cadeia de olivicultura, gerando rentabilidade para os produtores locais e, poderia originar maior qualidade e variedade de produtos para os consumidores.

O uso da folha da oliveira para enriquecer azeites de oliva é uma linha de pesquisa muito recente, onde existem poucas publicações sobre o tema. Alguns estudos já avaliam as formas de extração dos compostos da folha, quais são mais eficientes, os fatores que influenciam na diferença de composição e os principais compostos presentes. As principais pesquisas vêm apresentando resultados positivos, o que torna este trabalho bastante relevante, visto que temos uma produção emergente de azeite no estado, e as folhas das oliveiras são descartadas como resíduos da produção, enquanto poderiam ser utilizadas para enriquecimento de azeites de oliva, assim como de outros produtos alimentícios.

Por outro lado, as folhas de oliveira possuem uma concentração em compostos fenólicos totais bastante elevada e significativamente superior ao azeite de oliva e a azeitona, com alto potencial antioxidante. Desta forma, enriquecer o azeite de oliva com as folhas aumentaria suas concentrações de compostos fenólicos totais, aumentando sua vida de prateleira e seus benefícios para saúde humana. Outro fator relevante deste trabalho é o fato de gerar informação qualificada e de livre acesso à população brasileira, a partir de um estudo fortemente relacionado com a área das ciências da saúde.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar as principais características físico-químicas de três amostras de azeite de oliva extra virgens produzidas a partir de azeitonas da cultivar 'Koroneiki', cultivadas no Rio Grande do Sul, que foram enriquecidos com folhas de oliveira pelo método de maceração, armazenados pelo período de 12 meses.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar as características físico-químicas (acidez livre, peróxidos e absorvância no UV), compostos fenólicos totais, alfa-tocoferóis e o perfil de ácidos graxos dos azeites de oliva.
- Classificar as amostras de azeite de oliva, como extra virgem, virgem ou lampante, de acordo com os parâmetros de identidade e de qualidade estabelecidos.
- Comparar a composição físico-química durante o envelhecimento da amostra de azeite de oliva pura e das amostras enriquecidas com diferentes percentuais de folha de oliveira, pelo método de maceração, durante os 12 meses de armazenamento.

## 5 Metodologia

Para a realização desse trabalho, foram avaliadas amostras de azeites de oliva extra virgem produzido na safra de 2020, da varietal 'Koroneiki', cultivada no estado do Rio Grande do Sul. As amostras de azeite foram obtidas no mesmo período e a partir de azeitonas colhidas no início de março e com o mesmo índice de maturação. Após extração, as amostras de azeite foram mantidas à temperatura ambiente (25°C) e ao abrigo da luz para melhor conservação. O trabalho foi feito em parceria com a Superintendência do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a empresa "Prosperato", produtora do azeite de oliva utilizado nas análises.

As amostras enriquecidas foram preparadas a partir do método de maceração, no qual as folhas de oliveira foram adicionadas diretamente no azeite da variedade 'Koroneiki'. Para utilização, as folhas foram selecionadas e coletadas diretamente no olival, durante o inverno, em agosto de 2019 e a partir de árvores da variedade 'Koroneiki', com idade média de 08 anos, cultivadas no município de Barra do Ribeiro, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As folhas foram obtidas a partir de um cultivo orgânico.

As folhas foram lavadas em água deionizada, sanitizados sob imersão em solução com 1 g / 100 ml de hipoclorito de sódio por 10 min, e enxaguado com água deionizada. Em seguida, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de aproximadamente 37 °C por 48 h. Após a secagem, as folhas foram moídas (Thermomix, Vorwerk, Thousand Oaks, CA, USA) até obtenção de partículas finas. A farinha obtida foi peneirada (0,5 mm) e o tamanho médio das partículas foi de aproximadamente (0,2 mm). As folhas moídas obtidas foram acondicionadas e congeladas (-18 °C) até a sua utilização nas amostras de azeite de oliva.

Neste ensaio, foram adicionadas folhas de oliveira secas e moídas ao azeite de oliva extra virgem puro, realizadas em duas concentrações diferentes, 1% e 3% de folhas, permanecendo em processo de maceração por 12 meses, acondicionadas em temperatura ambiente (25°C), ao abrigo de luz e calor para melhor conservação. As amostras do azeite (puro, macerado com 1% e macerado com 3% de folhas de oliva, respectivamente) foram avaliadas em quatro tempos diferentes de seu

armazenamento sob abrigo da luz e a temperatura ambiente (média de 25 °C), tempo zero (quando foram preparadas), após 3 meses, após 6 meses e no final, aos 12 meses de armazenamento. As avaliações dos parâmetros físico-químicos foram realizadas em triplicata para aumentar a precisão dos resultados, que foram adicionados ao software Microsoft Excel para a análise dos dados.

## **5.1 Análises Físico-químicas**

No Brasil, os parâmetros físico-químicos de qualidade dos azeites de oliva são avaliados segundo a ANVISA, através da RDC 270/200523 (17) e pelo MAPA, através da Instrução Normativa nº 1, de 30 de janeiro de 2012 (18) e baseados em parâmetros internacionais (14–16). Neste trabalho, os parâmetros analisados foram acidez livre expressa em percentual de ácido oleico, índice de peróxidos, absorvância em ultravioleta a 270nm e 232nm, perfil de ácidos graxos livres, compostos fenólicos totais e tocoferóis. Todas as metodologias utilizadas estão de acordo com os métodos propostos pelo Codex Alimentarius (14) e pelo Conselho Oleícola Internacional (16,83–85).

### **5.1.1 Acidez Livre**

Para o experimento de determinação de acidez livre, 12 gramas de cada amostra foi pesada em frasco Erlenmeyer de 250 ml e, logo após, houve a diluição da alíquota com 50ml de solução éter: álcool neutra (1:1), após homogeneizada, foi adicionado o indicador fenolftaleína. Em seguida, realizou-se a titulação com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 molar até o aparecimento da coloração rósea e de sua permanência por pelo menos 10 segundos. Os resultados foram expressos em percentual de ácido oleico (85).

### **5.1.2 Índice de peróxidos**

No experimento de determinação do índice de peróxidos foi avaliada a capacidade das amostras em oxidar iodeto de potássio. Para a realização, 3 gramas de cada amostra foi pesada em frasco Erlenmeyer de 250 ml, seguido da adição de 15 ml de ácido acético, 10 ml de clorofórmio e 1 ml de uma solução saturada de iodeto de potássio. Em sequência, o frasco foi agitado manualmente, tampado e mantido ao abrigo de luz por 5 minutos. Após, houve a adição de 75 ml de água deionizada e 0,5 ml de uma solução de amido a 1%, utilizada como indicadora e foi

realizada a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01M até o desaparecimento da coloração azul. Os resultados foram expressos em miliequivalentes ou mmol de O<sub>2</sub>/kg (84).

### 5.1.3 Absorbância no Ultravioleta

Para a determinação da extinção específica foi utilizada a análise espectrofotométrica das amostras na região do ultravioleta. Para a realização, duas soluções com diferentes quantidades das amostras (A=0,25 gramas e B=0,05 gramas) foram preparadas em balões volumétricos de 25 ml. Após, houve a adição de ciclohexano até a marca volumétrica, seguido de homogeneização. As soluções tiveram a absorbância aferida nos seguintes comprimentos de onda: solução A em 266nm, 270nm e 274nm; e solução B, 232nm. Foi utilizado um espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV), modelo UV-1800 (Shimadzu, Tóquio, Japão) e um solvente puro como referência para aferição. A partir dos resultados obtidos foram calculados os parâmetros K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub> e  $\Delta K$  (83).

### 5.1.4 Ácidos Graxos Livres

Para a análise do perfil de ácidos graxos foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas, modelo GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Tóquio, Japão). Foi pesado 0,1 gramas de cada amostra em um tubo de ensaio com tampa de rosca de 5ml e, em seguida, houve adição de 2 ml de heptano e agitação. Na sequência foi adicionado 0,2 ml de uma solução de hidróxido de potássio e o tubo foi tampado e agitado vigorosamente por 30 segundos. A solução foi deixada em repouso para sua estratificação e decantação e a formação dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nas amostras e a fase contendo os ésteres metílicos foi coletada (86).

Foi realizada injeção automática, no modo split, na razão de 1:50, utilizando-se uma coluna capilar Elite-WAX com comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 cm e espessura do filme de 0,25  $\mu\text{m}$  (Pekin-Elmer, Waltham, MA, USA). A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C durante 1 minuto, sendo aumentada a uma taxa de 25 °C/minuto até a temperatura de 200 °C. Após, a temperatura continuou sendo aumentada a uma taxa de 3 °C/minuto até a temperatura final de 230 °C, permanecendo por 18 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio e a temperatura do injetor foi de 250 °C. A identificação dos ácidos graxos ocorreu por meio de

varredura de massas na faixa de 35 até 400 m/z. Tanto a temperatura da fonte como da interface foi de 250°C e o tempo de corte foi de 2,6 minutos. Utilizou-se padrão interno com 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) (22).

### **5.1.5 Compostos Fenólicos Totais**

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada a partir do método proposto por Vázquez-Roncero et al (87). Para a primeira etapa do experimento, foi realizada uma extração líquido-líquido. Uma alíquota de 5 gramas de cada amostra foi pesada em um frasco Erlenmeyer de 50 ml, seguido de adição de 25 ml de *n*-hexano e homogeneizado. A solução foi transferida para um funil de separação e adicionada de 10 ml de uma solução metanol: água (60:40) e agitada por 5 minutos. Após, houve a decantação e separação das fases líquidas, e a coleta da fase contendo a solução metanol: água. Esse processo foi repetido três vezes. O extrato final, contendo as três repetições de coleta dos compostos fenólicos, foi armazenado em um balão volumétrico de 50 ml, completando a marca volumétrica do balão com água ultra pura, e homogeneização.

Na segunda etapa do experimento, em um balão volumétrico de 25 ml foram adicionados 2,5 ml do extrato obtido, 17,5ml de água ultrapura e 1,25 ml do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). A solução foi agitada manualmente e permaneceu em repouso por 3 minutos. Na sequência, houve adição de 2,5 ml de solução de hidróxido de sódio 5% e de água ultra pura até a marca volumétrica do balão. A solução foi agitada em vórtex e repousada tampada e ao abrigo da luz por 45 minutos. Foi medida a absorbância da solução no comprimento de onda 725nm com a utilização de um espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV), modelo UV-1800 (Shimadzu, Tóquio, Japão). Com os resultados obtidos a partir da leitura espectrofotométrica e da curva padrão elaborada com seis diferentes concentrações de ácido cafeico a 500 mg/L, foram calculados os compostos fenólicos totais. Os resultados foram expressos como mg de ácido cafeico/Kg de azeite.

### 5.1.6 Tocoferóis

Os tocoferóis foram avaliados seguindo o padrão internacional ISO 9936 (2006) (88). Para a determinação, foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Para o experimento foram pesadas 0,8 gramas das amostras de azeite de oliva, em um balão volumétrico de 10 ml; na sequência foi adicionado n-hexano até completar o volume máximo do balão, seguido de homogeneização. Após, as amostras foram filtradas com filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  e transferidas para os vials de injeção, tampadas e identificadas.

Para a análise no HPLC, inicialmente foi preparada a fase móvel, composta por 0,5% de propan-3-ol em hexano (v/v). A coluna (Phenomenex, Lichrospher Sil 60) com fase C18 (octadecyl) de 250 x 4 mm x 5  $\mu\text{m}$  foi colocada no equipamento, o forno do equipamento foi mantido a temperatura constante de 25 °C. O fluxo da fase móvel foi mantido em sistema isocrático, de 0,5 mL/min. O detector de fluorescência foi programado para um comprimento de onda de excitação de 290 nm e um comprimento de onda de emissão de 330 nm. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  das amostras. Os alfa-tocoferóis foram identificados através da comparação do tempo de retenção de cada padrão de tocoferol utilizado, utilizando a curva padrão com a solução de alfa-tocoferol. A construção da curva foi realizada com 05 diferentes concentrações do tocoferol.

### 5.2 Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Todos os dados obtidos em triplicata foram analisados por análise de variância (ANOVA) com somas de quadrados tipo III e *post-hoc* de Tukey (HSD) foram aplicados e relatados como média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos foram comparados entre si e apenas o valor F com  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas usando o software STATISTICA 10 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

## 6 Resultados e Discussão

Os principais parâmetros de qualidade físico-química analisados, de acordo com a amostra comercial de azeite de oliva, estão descritos na **tabela 5**. As amostras apresentaram nível de acidez livre adequado e inferior ao limite de tolerância estabelecido para azeite de oliva extra virgem ( $\leq 0,80$ ) (14–18), ao longo de todo período de armazenamento. O índice de peróxidos também foi adequado e inferior ao limite de tolerância estabelecido para azeite de oliva extra virgem ( $\leq 20,00$ ) (14–18) em todas as amostras analisadas, ao longo de todo período de armazenamento. As variáveis da análise da extinção específica no ultravioleta K232, K270 e Delta-K obtiveram valores dentro dos padrões estabelecidos para extra virgem,  $\leq 2,50$ ,  $\leq 0,22$  e  $\leq 0,01$ , respectivamente (14–18), em todas as amostras analisadas, durante todo o período do estudo.

Tabela 5: Parâmetros de qualidade físico-químicas das amostras de azeite de oliva ao longo dos 12 meses de armazenamento.

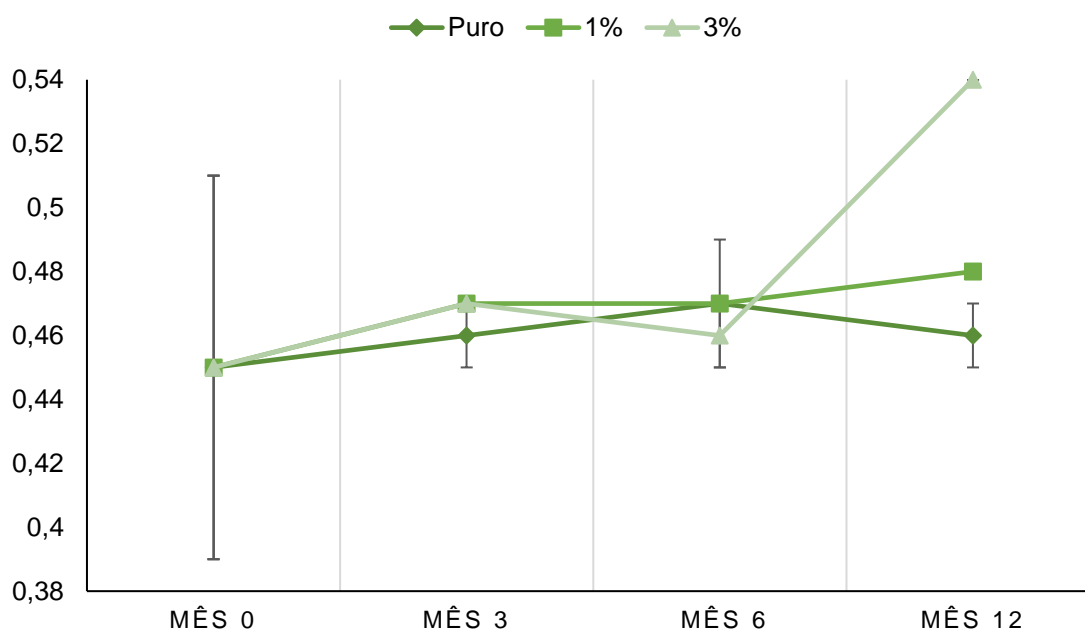
Amostra	Tempo (meses)	Acidez	Peróxidos	K232	K270	Delta K
Puro	0	0,45 ± 0,6 <sup>a</sup>	9,86 ± 0,04 <sup>bc</sup>	1,82 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,00
	3	0,46 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,05 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>cde</sup>	0,00
	6	0,47 ± 0,0 <sup>a</sup>	9,67 ± 0,08 <sup>abc</sup>	2,01 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>def</sup>	0,00
	12	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	19,15 ± 0,38 <sup>d</sup>	1,95 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>bcd</sup>	0,00
1%	0	0,45 ± 0,06 <sup>a</sup>	9,82 ± 0,04 <sup>abc</sup>	1,75 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>ef</sup>	0,00
	3	0,47 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,73 ± 0,23 <sup>ab</sup>	2,15 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,18 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,00
	6	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,40 ± 1,73 <sup>ab</sup>	1,80 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>bc</sup>	0,00
	12	0,48 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,92 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,96 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>cde</sup>	0,00
3%	0	0,45 ± 0,0 <sup>a</sup>	9,86 ± 0,04 <sup>bc</sup>	1,82 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,00
	3	0,47 ± 0,0 <sup>a</sup>	13,92 ± 0,02 <sup>cd</sup>	2,29 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,00 <sup>cde</sup>	0,00
	6	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,38 ± 2,51 <sup>ab</sup>	1,93 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00
	12	0,54 ± 0, <sup>b</sup>	4,79 ± 0,0 <sup>ab</sup>	1,90 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00

Resultados expressos como média (n=3) ± desvio padrão. Os valores médios dentro de cada coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A acidez livre é um dos parâmetros de qualidade mais antigos utilizado na avaliação da qualidade do azeite de oliva, ele representa a extensão das atividades hidrolíticas que as azeitonas foram submetidas antes do seu processamento (4). Óleos obtidos de frutos saudáveis, independentemente da cultivar, processados logo após a colheita, apresentam valores muito baixos de acidez livre (4). O grau de

acidez em percentual de ácido oleico fornece informações sobre as condições do fruto, ou seja, como o fruto foi manuseado antes do processamento. Um alto grau de acidez pode ser devido a lesões nas azeitonas, no momento da exposição à temperatura ambiente, favorecendo a atividade enzimática e aumentando os valores de acidez (4).

Figura 6: Variação da Acidez Livre (%) das amostras de azeite de oliva.



Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

A **figura 6** representa a variação da acidez livre das amostras analisadas ao longo dos 12 meses do estudo. A variação da amostra pura inicialmente foi de 0,45% aumentando para 0,46% ao final do estudo, enquanto as variações das amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas foi de 0,45% para 0,48% e 0,45% para 0,54%, respectivamente. Todas as amostras mantiveram-se dentro do limite de tolerância para classificação de extra virgem (80%) (14–18). As amostras não mostraram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) e ao longo do tempo, com exceção da amostra com 3% de folhas de oliveira no 12 mês do estudo.

Kiritsakis et al, em 2017, realizou um estudo para determinar o efeito do extrato aquoso de folha de oliveira durante o processo de malaxação no conteúdo fenólico total, atividade antioxidante, composição e parâmetros de qualidade do azeite de oliva (89). No estudo, a acidez livre da amostra enriquecida foi de 0,37%,

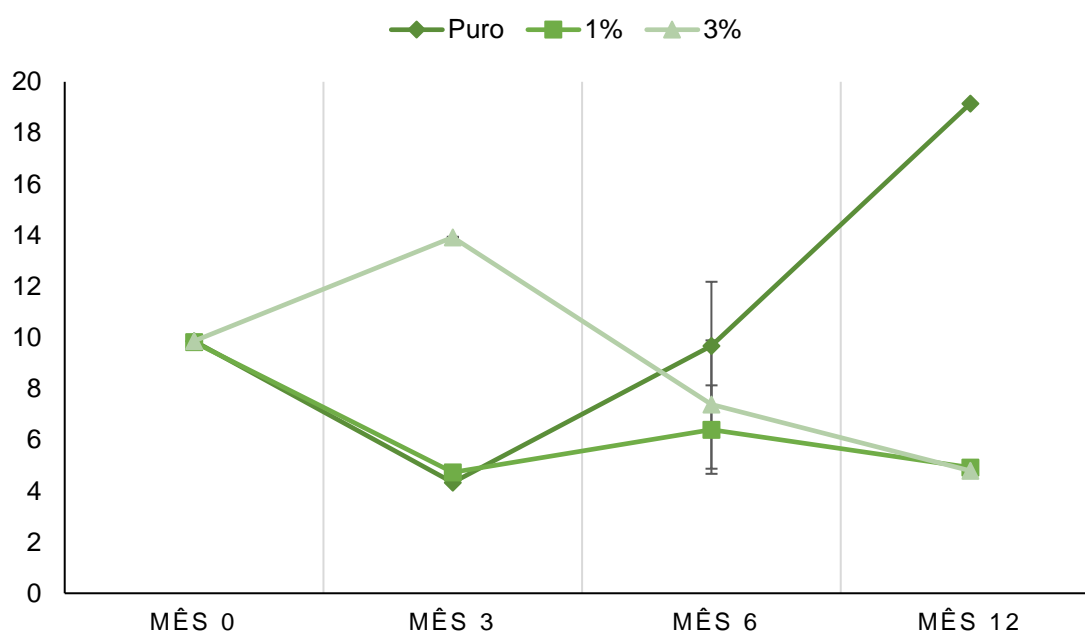
com diferenças significativas em relação à amostra controle – pura – com valor de 0,32% (89).

Tarchoune et al, em um estudo de 2019, avaliou os efeitos da adição de folha de oliveira (0 e 3%) sobre os principais antioxidantes e a atividade antioxidante dos azeites Neb Jmel e Oueslati (90). A acidez livre do azeite Neb Jmel não mostrou diferenças significativas entre a amostra pura e enriquecida (0,56% e 0,57%, respectivamente), já no azeite Oueslati foi encontrada diferença significativa (1,00% e 0,60%, respectivamente (90).

Malheiro et al, realizou um estudo, em 2011, com o objetivo de verificar o efeito da adição de folhas de oliveira durante o processo de extração do óleo na qualidade e composição dos azeites, com diferentes concentrações de folhas de oliveira (1%, 2,5% 5% e 10%) (91). A acidez livre apresentou diferenças significativas em todas as amostras (91). A amostra pura apresentou acidez livre de 0,31%, enquanto as amostras enriquecidas com 1%, 2,5% 5% e 10% apresentaram acidez de 0,35%, 0,37%, 0,39% e 0,44%, respectivamente (91).

O Índice de peróxido (IP) reflete o início da oxidação nos óleos (92,93). Para azeites extra virgens, o valor máximo de peróxido aceitável é de 20 mEq O<sub>2</sub>/kg (14–18). A principal forma de deterioração dos óleos é a oxidação, que ocorre quando o oxigênio atmosférico se dissolve no óleo e reage com seus componentes (92). Portanto, o índice de peróxido pode expressar o estado inicial do óleo, mas também indica a deterioração que certos componentes podem ter sofrido (92). O índice de peróxido determina a oxidação inicial, a reação de rancificação do azeite e a deterioração que pode ter ocorrido em antioxidantes naturais, como tocoferóis e polifenóis, principalmente (93).

Figura 7: Variação do Índice de Peróxidos (mEq O<sub>2</sub>/kg) das amostras de azeite de oliva.



Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

A **figura 7** representa a variação do índice de peróxidos das amostras analisadas ao longo dos 12 meses do estudo. A variação da amostra pura inicialmente foi de 9,86 mEq O<sub>2</sub>/kg, aumentando para 19,15 mEq O<sub>2</sub>/kg ao final do estudo, enquanto as variações das amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas tiveram diminuição no índice de 9,82 mEq O<sub>2</sub>/kg para 4,92 mEq O<sub>2</sub>/kg e 9,86 mEq O<sub>2</sub>/kg para 4,79 mEq O<sub>2</sub>/kg, respectivamente. Todas as amostras mantiveram-se dentro do limite de tolerância para classificação de extra virgem ( $\leq 20,0$  mEq O<sub>2</sub>/kg) (14–18). As amostras apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) e ao

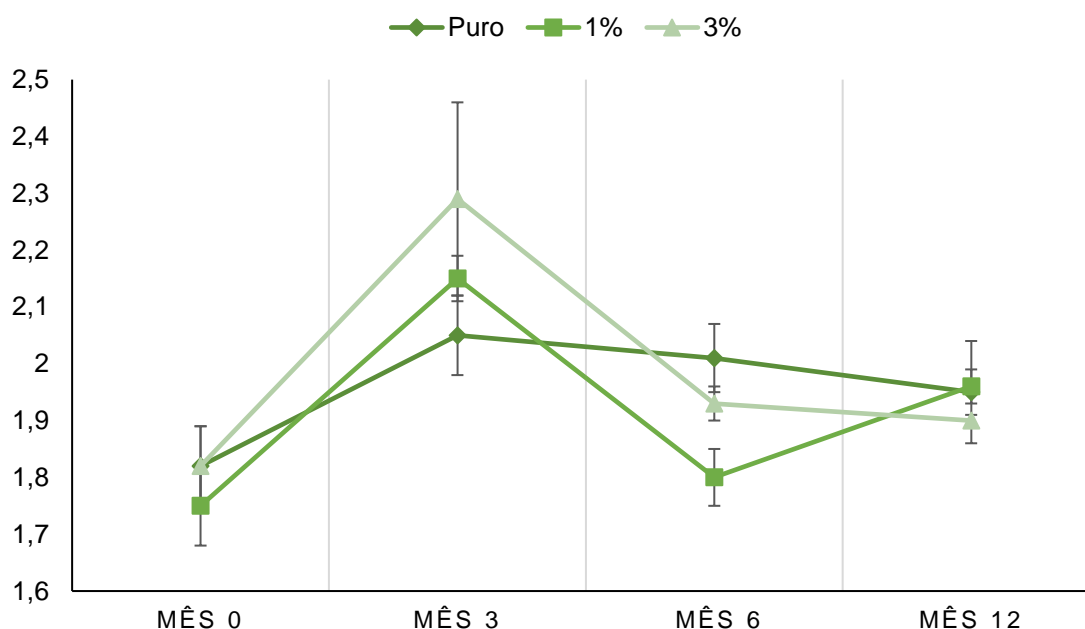
longo do tempo, principalmente comparando os índices das amostras enriquecidas (1% e 3%) com a amostra pura ao final do estudo.

Sahin et al. (2017) investigou o efeito do extrato de folha de oliveira, rico em oleuropeína, na qualidade do azeite de oliva extra virgem (94). Os resultados mostraram que o índice de peróxidos da amostra pura foi de 9,09 mEq O<sub>2</sub>/kg, e o da amostra enriquecida, 7,07 mEq O<sub>2</sub>/kg (94). Não houve discussão acerca de diferenças significativas no estudo, entretanto, é perceptível que houve um decaimento do índice, entre as amostras.

No estudo de Kiritsakis et al. (2017), o índice de peróxidos apresentou diferença significativa da amostra pura (9,62 mEq O<sub>2</sub>/kg) para a amostra enriquecida (9,28 mEq O<sub>2</sub>/kg) (89). Tarchoune et al (2019) não encontrou diferença significativa no índice de peróxidos do azeite Neb Jmel (6,00 mEq O<sub>2</sub>/kg na amostra pura e também 6,00 mEq O<sub>2</sub>/kg na amostra enriquecida), em contrapartida, o azeite Oueslati apresentou diferença significativa no índice (34,00 mEq O<sub>2</sub>/kg na amostra pura e 15,33 mEq O<sub>2</sub>/kg na amostra enriquecida) (90). Malheiro et al. (2011) encontrou diferenças significativas entre os índices de peróxidos da amostra pura (7 mEq O<sub>2</sub>/kg) e todas as amostras enriquecidas com as diferentes concentrações de folhas de oliveira - 1%, 2,5% 5% e 10% (12 mEq O<sub>2</sub>/kg, 8 mEq O<sub>2</sub>/kg, 12 mEq O<sub>2</sub>/kg, 10 mEq O<sub>2</sub>/kg, respectivamente) (91).

A extinção específica no ultravioleta é um parâmetro que avalia o grau de oxidação do azeite de oliva, através da mensuração da absorbância nos comprimentos de onda correspondentes às máximas absorções dos dienos e trienos conjugados, 232nm e 270nm, respectivamente. Tais compostos são formados a partir de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados no processo de autooxidação e/ou prática de refino (4,83). O valor de absorbância inferior a 0,22, na variável K270, indica um produto obtido a partir de uma matéria-prima de boa qualidade e produzido a partir de boas práticas de produção (92). As **figuras 8 e 9** representam as variações das variáveis estudadas na análise de absorbância no ultravioleta.

Figura 8: Variação de K232 das amostras de azeite de oliva.



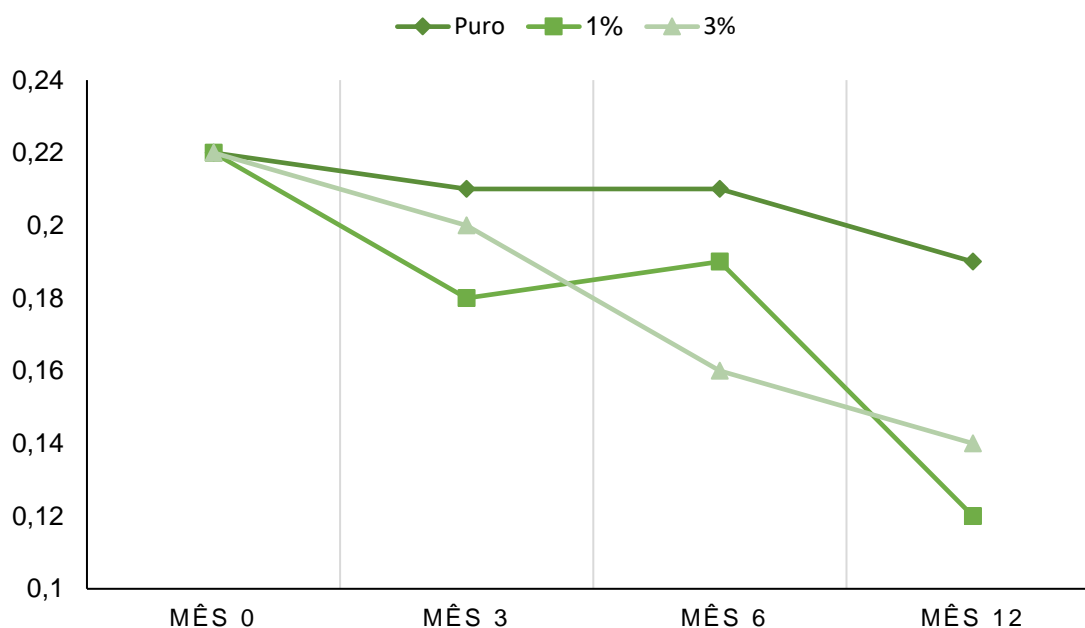
Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

A variação de K232 da amostra pura foi de 1,82 no tempo 0, 2,05 ao terceiro mês, 2,01 ao sexto mês e 1,95 no décimo segundo mês. Já as variações das amostras com 1% e 3% de folhas foram de: 1,82, 2,15, 1,80, 1,96; e 1,82, 2,29, 1,93 e 1,90, respectivamente. A amostra pura apresentou diferença significativa entre o estado inicial até o terceiro mês do estudo, não apresentando diferenças significativas entre o terceiro e o último mês. A amostra enriquecida com 1% de folhas apresentou diferença significativa apenas no sexto mês do estudo; e a

amostra enriquecida com 3% de folhas apresentou diferenças significativas entre o estado inicial, até o sexto mês do estudo, mantendo-se sem diferença significativa entre o sexto e o décimo segundo mês. Comparando as amostras entre si, nenhuma amostra apresentou diferenças significativas ao término do estudo.

Kiritsakis et al. (2017) encontrou diferença significativa nos valores de K232 em seu estudo, o valor da amostra pura foi de 1,70 enquanto a amostra enriquecida com o extrato aquoso de folha de oliveira apresentou o valor de 1,79 (89). Malheiro et al. (2011) também encontrou diferença significativa entre a amostra pura (1,63) e todas as amostras enriquecidas com as diferentes concentrações de folhas de oliveira - 1%, 2,5% 5% e 10% (1,93, 1,92, 1,92, 1,97 e 2,07, respectivamente), as amostras enriquecidas não apresentaram diferenças significativas entre si (91).

Figura 9: Variação de K270 das amostras de azeite de oliva.



Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

A variação de K270 da amostra pura foi de 0,22 no tempo 0, 0,21 ao terceiro mês, mantendo-se até o sexto mês e 0,19 no décimo segundo mês. Já as variações das amostras com 1% e 3% de folhas foram de: 0,22, 0,18, 0,19, 0,12; e 0,22, 0,2, 0,16 e 0,14, respectivamente. As amostras apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) e ao longo do tempo.

Kiritsakis et al. (2017) encontrou diferença significativa nos valores de K270 em seu estudo, o valor da amostra pura foi de 0,12 enquanto a amostra enriquecida com o extrato aquoso de folha de oliveira apresentou o valor de 0,13 (89). Malheiro et al. (2011) também encontrou diferença significativa entre a amostra pura (0,09) e todas as amostras enriquecidas com as diferentes concentrações de folhas de oliveira - 1%, 2,5% 5% e 10% (0,13, 0,12, 0,13 e 0,16 respectivamente), as amostras enriquecidas apresentaram diferenças significativas entre si, com exceção das amostras com 1% e 2,5% de adição de folhas (91).

A análise de extinção específica em 270 nm e 232 nm, bem como o Delta K para todas as amostras mantiveram-se dentro dos padrões estabelecidos para extra virgem, com valores abaixo de 0,22, 2,50 e 0,01 (14–18), respectivamente, ao longo de todo o estudo.

A **tabela 6** apresenta a concentração de compostos fenólicos totais e alfa-tocoferóis das amostras de azeite de oliva analisadas ao longo dos 12 meses de armazenamento.

Tabela 6: Concentração de Compostos Fenólicos Totais e Alfa-tocoferóis, em mg/kg, ao longo dos 12 meses de armazenamento.

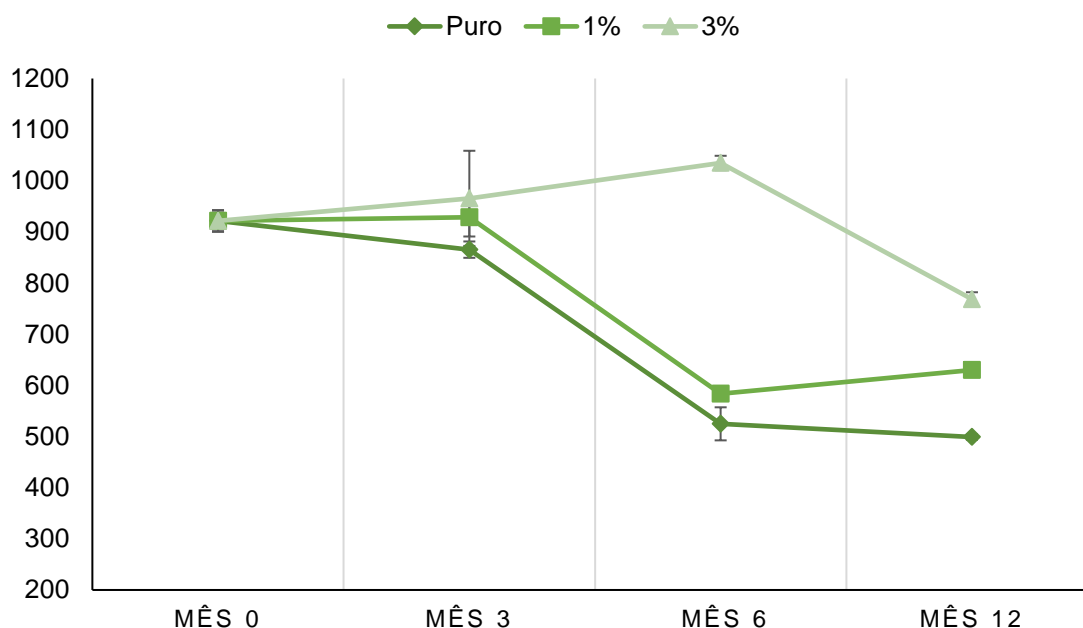
Amostra	Tempo (meses)	Compostos Fenólicos	Alfa-tocoferol
Puro	0	921,56 ± 20,73 <sup>cd</sup>	368,79 ± 0,99 <sup>h</sup>
	3	865,42 ± 16,00 <sup>cd</sup>	361,01 ± 0,87 <sup>g</sup>
	6	524,83 ± 32,31 <sup>a</sup>	275,62 ± 1,47 <sup>d</sup>
	12	499,02 ± 5,28 <sup>a</sup>	234,50 ± 1,77 <sup>a</sup>
1%	0	921,56 ± 20,73 <sup>cd</sup>	368,49 ± 0,99 <sup>h</sup>
	3	928,75 ± 37,6 <sup>cd</sup>	262,60 ± 0,95 <sup>b</sup>
	6	583,61 ± 10,19 <sup>ab</sup>	303,18 ± 1,79 <sup>f</sup>
	12	629,81 ± 2,46 <sup>ab</sup>	287,80 ± 1,53 <sup>h</sup>
3%	0	921,56 ± 20,73 <sup>cd</sup>	368,79 ± 0,99 <sup>h</sup>
	3	965,70 ± 93,02 <sup>cd</sup>	270,45 ± 3,83 <sup>c</sup>
	6	1034,86 ± 14,07 <sup>d</sup>	271,62 ± 1,18 <sup>c</sup>
	12	768,60 ± 13,48 <sup>bc</sup>	271,21 ± 2,93 <sup>c</sup>

Resultados expressos como média (n=3) ± desvio padrão. Os valores médios dentro de cada coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p < 0,05).

Os compostos fenólicos são componentes importantes para a qualidade e características sensoriais dos azeites de oliva (4,95). Além disso, são antioxidantes

muito eficazes, desempenhando um papel importante na dieta humana e saúde (95). A vida de prateleira de um óleo também está correlacionada com sua quantidade antioxidante natural (96). Os fenólicos retardam o processo de degradação oxidativa, prolongando a vida útil do produto (95,97).

Figura 10: Variação da Concentração de Compostos Fenólicos Totais (mg/kg).



Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

A **figura 10** representa a variação da concentração de compostos fenólicos totais das amostras de azeite de oliva analisadas. A variação da amostra pura foi de 921,56 mg/kg para 499,02 mg/kg ao final do estudo, enquanto as amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas foram de 921,56 mg/kg para 629,81 e 921,56 mg/kg para 768,60, respectivamente. As amostras apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) e ao longo do tempo, principalmente analisando o valor de compostos fenólicos totais da amostra pura com as amostras enriquecidas ao final do estudo, sendo o valor dos compostos das amostras enriquecidas superiores ao da amostra pura.

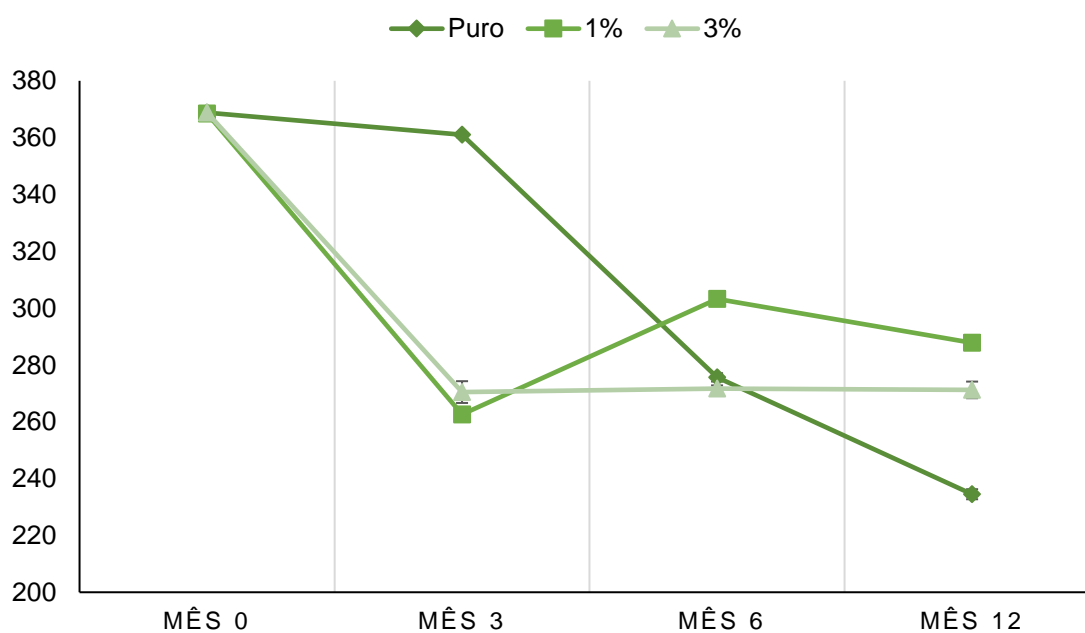
Salta et al., em 2007 realizou um estudo que avaliou o efeito do enriquecimento de óleos comercialmente disponíveis (azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de palma e gordura vegetal) com o extrato da folha da oliveira (98). O

aumento da concentração de compostos fenólicos totais do azeite de oliva foi de 103% (de 94 mg/kg para 299 mg/kg) (98).

Sahin et al. (2017) encontrou um aumento de quase duas vezes no valor de compostos fenólicos totais em relação ao azeite puro (94). Kiritsakis et al. (2017) encontrou diferença significativa entre o azeite de oliva enriquecido com o extrato da folha da oliveira em relação ao azeite puro. No estudo de Tarchoune et al (2019), a concentração fenólica total do azeite Neb Jmel (736 mg GA eq/kg de óleo) foi significativamente superior ao de Oueslati (528 mg GA eq/kg de óleo).

Os tocoferóis são compostos que fazem parte da vitamina E (99). Eles são encontrados em plantas e outros organismos vivos com atividade fotossintética (99,100). A presença de tocoferóis na maioria dos alimentos à base de lipídios, como sementes e óleos vegetais é muito importante, principalmente pela ação protetora exercida pelos tocoferóis para inibir atividades de espécies reativas de oxigênio, como peróxidos que por sua vez auxilia na prevenção da peroxidação lipídica nos alimentos (100,101). Os alfa-tocoferóis são um subgrupo dos tocoferóis, sendo o grupo mais abundante encontrado nos azeites de oliva (101).

Figura 11: Variação da Concentração de Alfa-tocoferol (mg/kg).



Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

A **figura 11** representa variação da concentração de alfa-tocoferol das amostras analisadas ao longo dos 12 meses do estudo. A variação da amostra pura foi de 368,79 mg/kg para 234,50 mg/kg, enquanto a variação das amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas de oliveira foi de 368,49 mg/kg para 303,18 mg/kg e 287,80 mg/kg para 271,21 mg/kg, respectivamente. As amostras apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) e ao longo do tempo. A figura mostra que a concentração final de alfa-tocoferóis das amostras enriquecidas foi superior à amostra pura.

Os resultados de Sahin et al. (2017) mostraram que a concentração de alfa-tocoferol da amostra pura foi de 114,38 ppm, e o da amostra enriquecida foi de 127,83 ppm (94). Não houve discussão acerca de diferenças significativas no estudo, entretanto, é perceptível que a concentração da amostra enriquecida é superior ao da amostra pura (94). Tarchoune et al (2019) encontrou diferença significativa na concentração de alfa-tocoferol do azeite Neb Jmel (283,6 mg/kg na amostra pura e 328,08 mg/kg na amostra enriquecida), em contrapartida, o azeite Oueslati não apresentou diferença significativa na concentração (90). Malheiro et al. (2011) encontrou diferença significativa apenas na amostra enriquecida com 10% de folhas de oliveira; 225 mg/kg na amostra pura e 254,7 mg/kg na amostra enriquecida (91).

A composição de ácidos graxos dos azeites, com diferentes percentuais de folhas de oliveira foram analisadas e o respectivos perfis são dados na **tabela 7**. O ácido graxo mais abundante dentre todas as amostras foi o ácido oleico (C18:1), seguido do ácido palmítico (C16:0) e ácido linoleico (C18:2) independentemente do percentual de folhas adicionado.

Tabela 7: Composição de Ácidos Graxos Livres, ao longo dos 12 meses de armazenamento, em g/100g de óleo.

A	T	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:2	C18:3	C18:1	C18:0	C20:1	C20:0	C22:0
Puro	0	20,05 ± 0,57 <sup>b</sup>	1,84 ± 0,09 <sup>bc</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,47 ± 0,64 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,02 <sup>a</sup>	62,70 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,89 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>abcd</sup>
	3	19,54 ± 0,29 <sup>ab</sup>	1,76 ± 0,04 <sup>abc</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,76 ± 0,13 <sup>bc</sup>	0,82 ± 0,04 <sup>a</sup>	62,55 ± 0,27 <sup>a</sup>	4,54 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>
	6	19,24 ± 0,57 <sup>ab</sup>	1,75 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,93 ± 0,64 <sup>c</sup>	0,82 ± 0,23 <sup>a</sup>	62,47 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,57 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>ab</sup>
	12	19,54 ± 0,29 <sup>ab</sup>	1,72 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,93 ± 0,13 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,04 <sup>a</sup>	62,45 ± 0,27 <sup>a</sup>	4,43 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>abc</sup>
1%	0	19,31 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,09 <sup>abc</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,63 ± 0,64 <sup>abc</sup>	0,88 ± 0,02 <sup>a</sup>	62,91 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,92 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>abcd</sup>
	3	19,77 ± 0,75 <sup>ab</sup>	1,87 ± 0,09 <sup>c</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,70 ± 0,64 <sup>abc</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>a</sup>	62,90 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,94 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>e</sup>
	6	19,82 ± 0,57 <sup>ab</sup>	1,83 ± 0,09 <sup>bc</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,66 ± 0,64 <sup>ab</sup>	0,87 ± 0,02 <sup>a</sup>	62,93 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>abcd</sup>
	12	19,77 ± 0,57 <sup>ab</sup>	1,85 ± 0,09 <sup>bc</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,69 ± 0,64 <sup>abc</sup>	0,86 ± 0,02 <sup>a</sup>	62,90 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>abcd</sup>
3%	0	19,42 ± 0,57 <sup>ab</sup>	1,84 ± 0,09 <sup>bc</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,19 ± 0,64 <sup>abc</sup>	0,87 ± 0,02 <sup>a</sup>	62,04 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,89 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>bcd</sup>
	3	19,71 ± 0,16 <sup>ab</sup>	1,85 ± 0,05 <sup>bc</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,38 <sup>abc</sup>	0,87 ± 0,11 <sup>a</sup>	61,48 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,96 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>cd</sup>
	6	19,67 ± 0,15 <sup>ab</sup>	1,82 ± 0,02 <sup>abc</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,13 <sup>abc</sup>	0,84 ± 0,02 <sup>a</sup>	61,52 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,92 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>bcd</sup>
	12	19,67 ± 0,08 <sup>ab</sup>	1,82 ± 0,01 <sup>abc</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,13 <sup>abc</sup>	0,84 ± 0,03 <sup>a</sup>	62,18 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,81 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>bcd</sup>

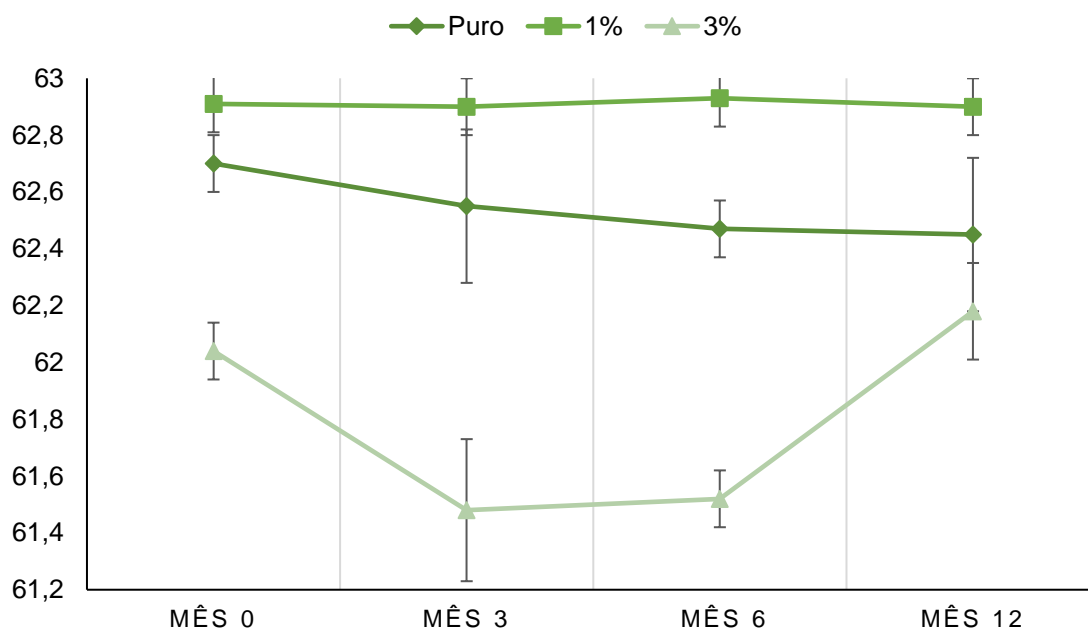
Resultados expressos como média (n=3) ± desvio padrão. A – Amostra. T – Tempo, em meses. Os valores médios dentro de cada coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p < 0,05).

Dentre os ácidos graxos analisados, os ácidos cis-10-heptadecenoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), linolênico (C18:3), oleico (C18:1), esteárico (C18:0), gadoleico. (C20:1) não apresentaram diferenças significativas (p < 0,05) entre as amostras e ao longo do estudo. O restante dos ácidos graxos apresentou baixa diferença significativa entre as amostras e ao longo do tempo. Os valores dos

ácidos graxos analisados estão de acordo com os regulamentados para classificação de azeite de oliva extra virgem.

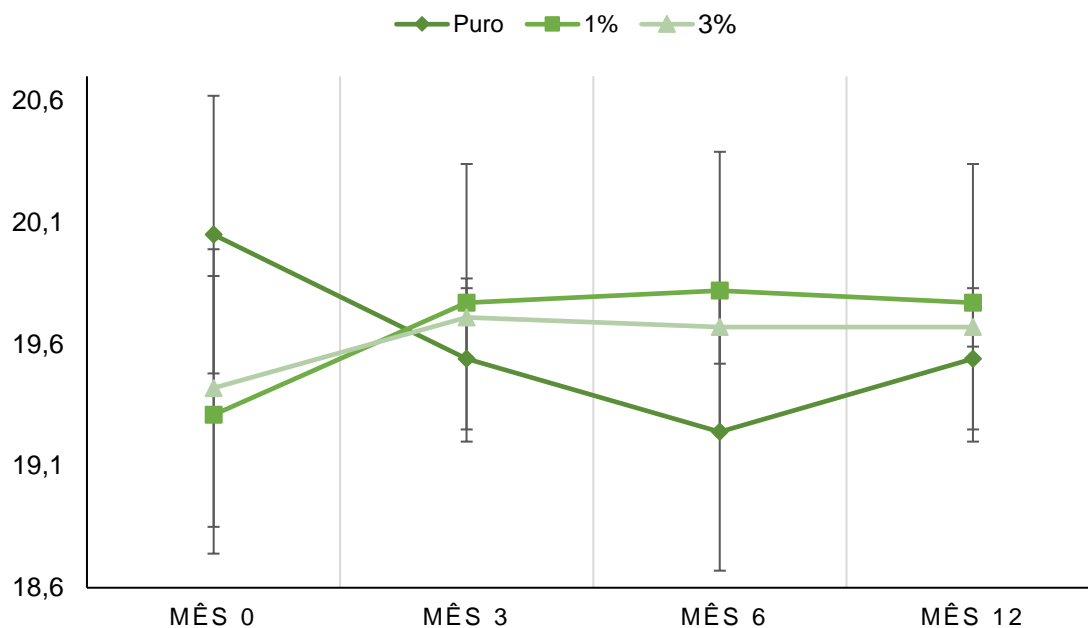
As **figuras 12, 13 e 14** expressam as variações de ácido oleico, palmítico e linoleico, respectivamente, das amostra de azeite de oliva ao longo dos 12 meses do estudo. O conteúdo dos três principais ácidos graxos não seguiu tendência com as concentrações de folhas de oliveira adicionadas.

Figura 12: Variação de ácido oleico das amostras de azeite de oliva.



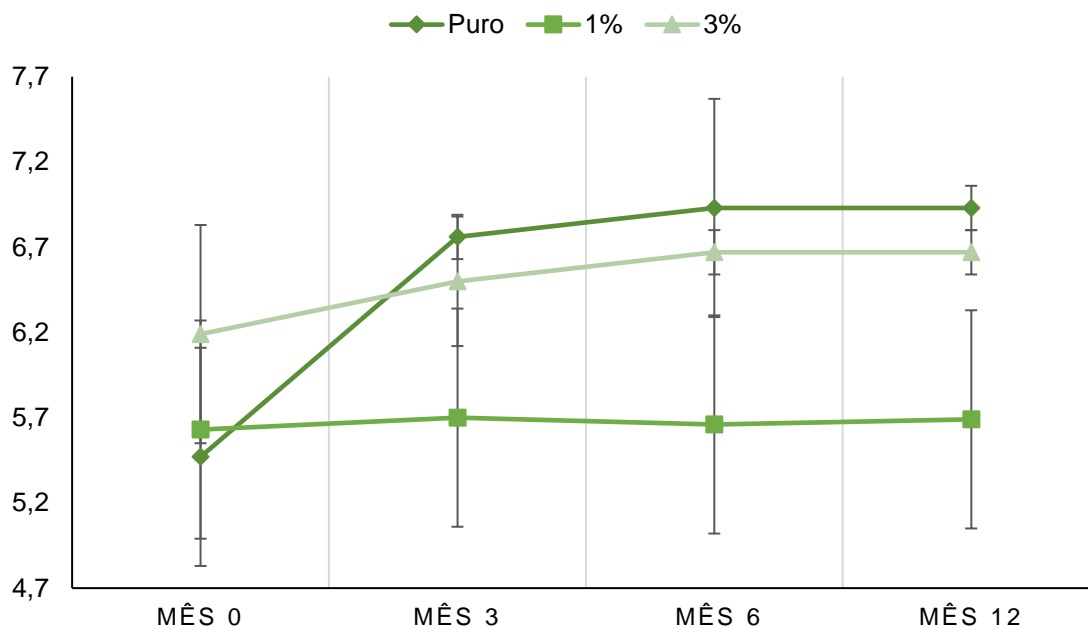
Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

Figura 13: Variação de ácido palmítico das amostras de azeite de oliva.



Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

Figura 14: Variação de ácido linoleico das amostras de azeite de oliva.



Resultados expressos como média (n=3) e barras de erro com desvio padrão.

Malheiro et al. (2011) encontrou valores superiores de ácido oleico em todas as amostras enriquecidas com concentrações de folhas de oliveira (1%, 2,5% 5% e 10%), com valores que variaram entre 72,18% e 73,13%; inferiores em ácido

palmítico, com valores que variaram entre 10,32% e 10,50%; e superiores de ácido linoleico, com valores que variaram entre 8,35% e 8,75% (91). Essa diferenciação pode ser explicada pela diferenciabilidade fenotípica entre as azeitonas Koroneiki e Cobrançosa, frutos utilizados na extração dos azeites utilizados nesse estudo e o de Malheiro et al. 2011, respectivamente, e também nas condições ambientais relativas ao cultivo das cultivares (4). Malheiro também não encontrou tendências no conteúdo dos três principais ácidos graxos com as quantidades crescentes de folhas de oliveira adicionadas (91).

## 7 Conclusão

Este trabalho avaliou a influência do enriquecimento de azeites de oliva com folhas de oliveiras nas características físico-químicas, compostos fenólicos totais, alfa-tocoferóis e ácidos graxos livres de três azeites de oliva produzidos no estado do Rio Grande do Sul. Todos os azeites apresentaram bons níveis de qualidade físico-química, estando de acordo com os parâmetros estabelecidos internacionalmente para classificação de extra virgem. Altas taxas de polifenóis totais e alfa-tocoferóis também foram encontrados e estão de acordo com dados encontrados na literatura. A concentração de ácidos graxos livres apresentou correlação com as concentrações esperadas para os azeites de oliva, sendo os ácidos oleico, palmítico e linoleico os mais abundantes encontrados.

Analisando os principais indicativos de oxidação dos azeites (índice de peróxidos, compostos fenólicos totais, e alfa-tocoferóis) foi encontrada correlação positiva estatisticamente significativa entre os índices da amostra pura e das amostras enriquecidas com folhas de oliveira (1% e 3%).

Assim, a utilização da folha da oliveira, um subproduto da indústria de azeites de oliva, no enriquecimento de azeites de oliva pode servir como uma maneira natural de melhorar a funcionalidade e a vida útil do produto. A adição de uma pequena porcentagem de folhas de oliveira pode melhorar as propriedades dos azeites extra virgens, aumentando seus teores de compostos fenólicos. Esses compostos, juntamente com os tocoferóis, desempenham um importante papel protetor contra o processo oxidativo, sendo também capazes de prolongar a vida útil do produto devido às suas propriedades antioxidantes. Este estudo poderá servir como uma base para a melhoria do processo de produção de azeites de oliva, ao mesmo tempo em que o subproduto é utilizado, reduzindo o impacto do desperdício do potencial aditivo. Apesar dos resultados promissores, mais pesquisas devem ser realizadas, em termos de fontes alternativas de compostos fenólicos ou extratos com diferentes concentrações e mais tempo de análises para concluir hipóteses mais seguras.

## 8 Referências

1. Wrege M, Coutinho E. Zoneamento edafoclimático da olivicultura. In: Zoneamento Edafoclimático da Olivicultura para o Rio grande do Sul. Brasília: Embrapa Clima Temperado; 2013. p. 11–20.
2. IBRAOLIVA. Projeção do mercado oleícola para os próximos anos. <https://www.ibraoliva.com.br/sobre>. 2022.
3. Oliveira A, Antunes L, Schuch M. Caracterização morfológica de cultivares de oliveira em coleção e considerações sobre o seu cultivo no Brasil. Informe Agropecuário v27 n231. 2006;
4. Boskou D. Olive Oil Chemistry and Technology. 2nd ed. Thessaloniki, Greece: AOCS Press.; 2006.
5. Alves A. Técnicas analíticas de controlo de qualidade de azeites. Tomar, Portugal; 2013.
6. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, et al. Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. International Journal of Molecular Sciences. 2014 Oct 14;15(10):18508–24.
7. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. The American Journal of Clinical Nutrition. 1995 Jun 1;61(6):1402S-1406S.
8. Herrero M, Temirzoda TN, Segura-Carretero A, Quirantes R, Plaza M, Ibañez E. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. Journal of Chromatography A. 2011 Oct;1218(42):7511–20.
9. Briante R, Patumi M, Terenziani S, Bismuto E, Febbraio F, Nucci R. *Olea europaea* L. Leaf Extract and Derivatives: Antioxidant Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002 Aug 1;50(17):4934–40.
10. Tarchoune I, Sgherri C, Eddouzi J, Zinnai A, Quartacci M, Zarrouk M. Olive Leaf Addition Increases Olive Oil Nutraceutical Properties. Molecules. 2019 Feb 2;24(3):545.
11. Reboredo-Rodríguez P, Figueiredo-González M, González-Barreiro C, Simal-Gándara J, Salvador MD, Cancho-Grande B, et al. State of the Art on Functional Virgin Olive Oils Enriched with Bioactive Compounds and Their Properties. International Journal of Molecular Sciences. 2017 Mar 20;18(3):668.
12. Peršurić Ž, Saftić L, Klisović D, Kraljević Pavelić S. Polyphenol-Based Design of Functional Olive Leaf Infusions. Food Technol Biotechnol. 2019;57(2):171–82.
13. Tejada S, Pinya S, Mar Bibiloni M del, Tur JA, Pons A, Sureda A. Cardioprotective Effects of the Polyphenol Hydroxytyrosol from Olive Oil. Current Drug Targets. 2017 Sep 14;18(13).
14. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils.
15. European Union. Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. 2013.

16. International Olive Council. COI/T.15/NC No 3/Rev. 17: Trade Standard Applying to Olive oils and Olive Pomace Oils . Madrid, Espanha; 2021 Nov.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 270, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270\\_22\\_09\\_2005.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270_22_09_2005.html); 2005.
18. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PEA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 30 DE JANEIRO DE 2012. 2012.
19. INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 10: SENSORY ANALYSIS OF OLIVE OIL METHOD FOR THE ORGANOLEPTIC ASSESSMENT OF VIRGIN OLIVE OIL. 2018.
20. INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. COI/T.20/Doc. No 14/Rev. 7: SENSORY ANALYSIS OF OLIVE OIL STANDARD GUIDE FOR THE SELECTION, TRAINING AND QUALITY CONTROL OF VIRGIN OLIVE OIL TASTERS – QUALIFICATIONS OF TASTERS, PANEL LEADERS AND TRAINERS. . 2021.
21. Coutinho E, Cappellaro T, Ribeiro F, Haerter J. Cultivo da Oliveira (*Olea europaea* L.). In: Sistemas de Produção 16. Pelotas; 2009. p. 18–20.
22. Neto J, Oliveira A, Oliveira N, Duarte H, Gonçalves E. Aspectos técnicos da cultura da oliveira. Belo Horizonte; 2008.
23. Urieta D, Menor A, Caño S, Barreal J, Velasco M, Puentes R, et al. A olivicultura internacional. Difusão histórica, análise estratégica e visão descritiva. Fundação Caja Rural; 2019.
24. Coutinho E, Jorge R. Olivicultura: Mundo e Brasil. In: Zoneamento Edafoclimático da Olivicultura para o Rio Grande do Sul. Brasília: Embrapa Clima Temperado; 2013. p. 9–10.
25. Secretaria da Agricultura P e DR. Pró-Oliva. <https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>.
26. Martínez J. La Expansión Geográfica de la Olivicultura en la Globalización. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alicante; 2016.
27. International Olive Council. IOOC. <https://www.internationaloliveoil.org/>.
28. Lipp JP, Almeida G, Ambrosini L. Nota Técnica: Cadastro Olivícola 2017. 2017.
29. Almeida G. Mapeamento do Cultivo da Oliveira no Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2018.
30. Coutinho E, Wrege M, Júnior M, Almeida I, Steinmertz S. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). In: Sistemas de Produção 16. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2009. p. 29–34.
31. Kandyli P, Vekiari AS, Kanellaki M, Grati Kamoun N, Msallem M, Kourkoutas Y. Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. LWT - Food Science and Technology. 2011 Jun;44(5):1333–41.
32. Vekiari SA, Oreopoulou V, Kourkoutas Y, Kamoun N, Msallem M, Psimouli V, et al. Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the Throumbolia and Koroneiki varieties from southern Greece. Grasas y Aceites. 2010 Sep 30;61(3):221–31.
33. Cappellaro T, Coutinho E, Ribeiro F, Araújo F, Faria M. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). In: Sistemas de Produção 16. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2009. p. 42–8.

34. Cunha S. Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas: Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas. [Porto, Portugal]: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2007.
35. Wachuła K, Furman J, Łabuz-Roszak B. THE MEDITERRANEAN DIET IN THE PREVENTION OF CARDIOVASCULAR AND NERVOUS SYSTEM DISEASES – THE ASSESSMENT OF NUTRITIONAL KNOWLEDGE. *Wiadomości Lekarskie*. 2020 Jul;73(7):1448–53.
36. International Olive Council. Missions (Who We Are). <https://www.internationaloliveoil.org/about-ioc/mission-basic-text/>.
37. Helsing E. Trends in fat consumption in Europe and their influence on the Mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr*. 1993 Sep;47 Suppl 1:S4-12.
38. Grigg D. Olive oil, the Mediterranean and the world. *GeoJournal*. 2001;Vol. 53, No. 2.
39. Sacchi R, Paduano A, Savarese M, Vitaglione P, Fogliano V. Extra Virgin Olive Oil: From Composition to “Molecular Gastronomy.” In 2014. p. 325–38.
40. INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. COI/T.20/Doc. No 4/Rev. 1: SENSORY ANALYSIS OF OLIVE OIL STANDARD SENSORY ANALYSIS: GENERAL BASIC VOCABULARY. 2007.
41. Bongartz A, Oberg D. Sensory Evaluation of Extra Virgin Olive Oil (EVOO) Extended to Include the Quality Factor “Harmony” . *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2011;
42. Bendini A, Cerretani L, Salvador M, Fregapane G. STABILITY OF THE SENSORY QUALITY OF VIRGIN OLIVE OIL DURING STORAGE: AN OVERVIEW. *ITALIAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE*. 2009;
43. Cláudio AFM, Cognigni A, de Faria ELP, Silvestre AJD, Zirbs R, Freire MG, et al. Valorization of olive tree leaves: Extraction of oleanolic acid using aqueous solutions of surface-active ionic liquids. *Separation and Purification Technology*. 2018 Oct;204:30–7.
44. Olmo-García L, Bajoub A, Benlamaalam S, Hurtado-Fernández E, Bagur-González M, Chigr M, et al. Establishing the Phenolic Composition of *Olea europaea* L. Leaves from Cultivars Grown in Morocco as a Crucial Step Towards Their Subsequent Exploitation. *Molecules*. 2018 Oct 2;23(10):2524.
45. Tarchoune I, Sgherri C, Eddouzi J, Zinnai A, Quartacci MF, Zarrouk M. Olive Leaf Addition Increases Olive Oil Nutraceutical Properties. *Molecules*. 2019 Feb 2;24(3).
46. Vlaveciski F, Young M, Tsiani E. Antidiabetic Effects of Hydroxytyrosol: In Vitro and In Vivo Evidence. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Jun 21;8(6).
47. Soliman GA, Saeedan AS, Abdel-Rahman RF, Ogaly HA, Abd-Elsalam RM, Abdel-Kader MS. Olive leaves extract attenuates type II diabetes mellitus-induced testicular damage in rats: Molecular and biochemical study. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019 Mar;27(3):326–40.
48. Araki R, Fujie K, Yuine N, Watabe Y, Nakata Y, Suzuki H, et al. Olive leaf tea is beneficial for lipid metabolism in adults with prediabetes: an exploratory randomized controlled trial. *Nutrition Research*. 2019 Jul;67:60–6.

49. Edziri H, Jaziri R, Chehab H, Verschaeve L, Flamini G, Boujnah D, et al. A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars. *Heliyon*. 2019 May;5(5):e01604.
50. Robert P, Zamorano M, González E, Silva-Weiss A, Cofrades S, Giménez B. Double emulsions with olive leaves extract as fat replacers in meat systems with high oxidative stability. *Food Research International*. 2019 Jun;120:904–12.
51. Djenane D, Gómez D, Yangüela J, Roncalés P, Ariño A. Olive Leaves Extract from Algerian Oleaster (*Olea europaea* var. *sylvestris*) on Microbiological Safety and Shelf-life Stability of Raw Halal Minced Beef during Display. *Foods*. 2018 Dec 26;8(1):10.
52. al Juhaimi F, Özcan MM, Uslu N, Ghafoor K, Babiker EE, Adiamo OQ, et al. The effects of conventional heating on phenolic compounds and antioxidant activities of olive leaves. *Journal of Food Science and Technology*. 2018 Oct 11;55(10):4204–11.
53. Jacques A, Antunes B, Santos L. DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES E CLOROFILAS EM FARINHA DE FOLHA DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.) OBTIDA POR LIOFILIZAÇÃO. 2017;
54. Cavalheiro CV, Rosso VD, Paulus E, Cichoski AJ, Wagner R, Menezes CR de, et al. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. *Ciência Rural*. 2014 Oct;44(10):1874–9.
55. Boudhrioua N, Bahloul N, ben Slimen I, Kechaou N. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*. 2009 Mar;29(2–3):412–9.
56. Bouallagui Z, Mahmoudi A, Maalej A, Hadrich F, Isoda H, Sayadi S. Contribution of Major Polyphenols to the Antioxidant Profile and Cytotoxic Activity of Olive Leaves. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019 Dec 11;19(13):1651–7.
57. Ghomari O, Sounni F, Massaoudi Y, Ghanam J, Drissi Kaitouni LB, Merzouki M, et al. Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnology Reports*. 2019 Sep;23:e00347.
58. Cavalheiro CV, Rosso VD, Paulus E, Cichoski AJ, Wagner R, Menezes CR de, et al. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. *Ciência Rural*. 2014 Oct;44(10):1874–9.
59. Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M. Olive Tree (*Olea europeae* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants*. 2015 Nov 3;4(4):682–98.
60. Leporatti ML, Posocco E, Pavesi A. Some new therapeutic uses of several medicinal plants in the province of Terni (Umbria, Central Italy). *Journal of Ethnopharmacology*. 1985 Sep;14(1):65–8.
61. Kranz P, Braun N, Schulze N, Kunz B. Sensory Quality of Functional Beverages: Bitterness Perception and Bitter Masking of Olive Leaf Extract Fortified Fruit Smoothies. *Journal of Food Science*. 2010 Aug;75(6):S308–11.
62. Lesschaeve I, Noble AC. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005 Jan 1;81(1):330S-335S.

63. Javadi H, Yaghoobzad H, Esfahani Z, Reza Memar M, Mehdi Mirh S. Effects of Olive Leaf Extract on Metabolic Response, Liver and Kidney Functions and Inflammatory Biomarkers in Hypertensive Patients. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2019 Jun 15;22(7):342–8.
64. Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Moccetti T, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*. 2011 Feb;18(4):251–8.
65. Stevens Y, Winkens B, Jonkers D, Masclee A. The effect of olive leaf extract on cardiovascular health markers: a randomized placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Nutrition*. 2021 Jun 9;60(4):2111–20.
66. Kerimi A, Nyambe-Silavwe H, Pyner A, Oladele E, Gauer JS, Stevens Y, et al. Nutritional implications of olives and sugar: attenuation of post-prandial glucose spikes in healthy volunteers by inhibition of sucrose hydrolysis and glucose transport by oleuropein. *European Journal of Nutrition*. 2019 Apr 9;58(3):1315–30.
67. Filip R, Possemiers S, Heyerick A, Pinheiro I, Raszewski G, Davicco MJ, et al. Twelve-month consumption of a polyphenol extract from olive (*Olea europaea*) in a double blind, randomized trial increases serum total osteocalcin levels and improves serum lipid profiles in postmenopausal women with osteopenia. *J Nutr Health Aging*. 2015 Jan 10;19(1):77–86.
68. Wainstein J, Ganz T, Boaz M, Bar Dayan Y, Dolev E, Kerem Z, et al. Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats. *Journal of Medicinal Food*. 2012 Jul;15(7):605–10.
69. de Bock M, Derraik JGB, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, et al. Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLoS ONE*. 2013 Mar 13;8(3):e57622.
70. Kendall M, Batterham M, Obied H, Prenzler PD, Ryan D, Robards K. Zero effect of multiple dosage of olive leaf supplements on urinary biomarkers of oxidative stress in healthy humans. *Nutrition*. 2009 Mar;25(3):270–80.
71. Lockyer S, Corona G, Yaqoob P, Spencer JPE, Rowland I. Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *British Journal of Nutrition*. 2015 Jul 14;114(1):75–83.
72. Tenore GC, Caruso D, D'Avino M, Buonomo G, Caruso G, Ciampaglia R, et al. A Pilot Screening of Agro-Food Waste Products as Sources of Nutraceutical Formulations to Improve Simulated Postprandial Glycaemia and Insulinaemia in Healthy Subjects. *Nutrients*. 2020 May 1;12(5):1292.
73. Pyner A, Chan SY, Tumova S, Kerimi A, Williamson G. Indirect Chronic Effects of an Oleuropein-Rich Olive Leaf Extract on Sucrase-Isomaltase In Vitro and In Vivo. *Nutrients*. 2019 Jul 1;11(7):1505.
74. Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *European Journal of Nutrition*. 2017 Jun 7;56(4):1421–32.

75. Hassen I, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. *Journal of Functional Foods*. 2015 Oct;18:926–40.
76. El SN, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*. 2009 Nov;67(11):632–8.
77. Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho A v., Boas LV. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*. 2006 Oct 3;12(5):385–95.
78. Kountouri AM, Mylona A, Kaliora AC, Andrikopoulos NK. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine*. 2007 Oct;14(10):659–67.
79. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*. 2000 Aug;38(8):647–59.
80. Ganje M, Jafari SM, Dusti A, Dehnad D, Amanjani M, Ghanbari V. Modeling quality changes in tomato paste containing microencapsulated olive leaf extract by accelerated shelf life testing. *Food and Bioprocess Technology*. 2016 Jan;97:12–9.
81. Alirezalu K, Hesari J, Eskandari MH, Valizadeh H, Sirousazar M. Effect of Green Tea, Stinging Nettle and Olive Leaves Extracts on the Quality and Shelf Life Stability of Frankfurter Type Sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2017 Oct;41(5):e13100.
82. Khemakhem I, Fuentes A, Lerma-García MJ, Ayadi MA, Bouaziz M, Barat JM. Olive leaf extracts for shelf life extension of salmon burgers. *Food Science and Technology International*. 2019 Mar 27;25(2):91–100.
83. International Olive Council. COI/T.20/Doc. No 19/Rev. 5: SPECTROPHOTOMETRIC INVESTIGATION IN THE ULTRAVIOLET. 2019.
84. International Olive Council. COI/T.20/Doc. No 35/Rev.1: DETERMINATION OF PEROXIDE VALUE 1. SCOPE. 2017.
85. International Olive Council. COI/T.20/Doc. No 34/Rev. 1: DETERMINATION OF FREE FATTY ACIDS, COLD METHOD. 2017.
86. International Olive Council. COI/T.20/Doc. No 33/Rev.1: DETERMINATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS BY GAS CHROMATOGRAPHY. 2017.
87. Roncero V, del Valle J. Determinacion de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas Y Aceites*. 1973;
88. International Organization for Standardization. Animal and vegetable fats and oils — Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography. 2006.
89. Kiritsakis K, Rodríguez-Pérez C, Gerasopoulos D, Segura- Carretero A. Olive oil enrichment in phenolic compounds during malaxation in the presence of olive leaves or olive mill wastewater extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017 Sep 8;119(9):1600425.

90. Tarchoune I, Sgherri C, Eddouzi J, Zinnai A, Quartacci M, Zarrouk M. Olive Leaf Addition Increases Olive Oil Nutraceutical Properties. *Molecules*. 2019 Feb 2;24(3):545.
91. Malheiro R, Casal S, Teixeira H, Bento A, Pereira JA. Effect of Olive Leaves Addition during the Extraction Process of Overmature Fruits on Olive Oil Quality. *Food and Bioprocess Technology*. 2013 Feb 10;6(2):509–21.
92. Mello L, Pinheiro M. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE AZEITES DE OLIVA E DE FOLHAS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE CULTIVARES DO RS, BRASIL. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2012;
93. Cardoso SM, Mafra I, Reis A, Nunes C, Saraiva JA, Coimbra MA. Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *LWT - Food Science and Technology*. 2010 Jan;43(1):153–60.
94. Şahin S, Sayım E, Bilgin M. Effect of olive leaf extract rich in oleuropein on the quality of virgin olive oil. *Journal of Food Science and Technology*. 2017 May 1;54(6):1721–8.
95. Bouaziz M, Chamkha M, Sayadi S. Comparative Study on Phenolic Content and Antioxidant Activity during Maturation of the Olive Cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004 Aug 1;52(17):5476–81.
96. Cinquanta L, Esti M, Notte E Ia. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *J Am Oil Chem Soc*. 1997 Oct;74(10):1259–64.
97. Gambacorta G, Faccia M, Previtali MA, Pati S, Notte E Ia, Baiano A. Effects of Olive Maturation and Stoning on Quality Indices and Antioxidant Content of Extra Virgin Oils (cv. *Coratina*) during Storage. *Journal of Food Science*. 2010 Apr;75(3):C229–35.
98. Salta FN, Mylona A, Chiou A, Boskou G, Andrikopoulos NK. Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology International*. 2007 Dec 4;13(6):413–21.
99. Duncan SE, Chang HH. Implications of Light Energy on Food Quality and Packaging Selection. In 2012. p. 25–73.
100. Mokrosnop VM. Functions of tocopherols in the cells of plants and other photosynthetic organisms. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014 Oct 27;86(5):26–36.
101. Thomas B, Murphy DJ, Murray BG. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2nd ed. Vol. 1. Oxford, UK: Elsevier; 2017. 335–339 p.