

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

Luana Souza Cavalcante

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E  
 $\alpha$ -TOCOFEROL EM AZEITES DE OLIVA ENRIQUECIDOS COM FOLHAS DE  
OLIVEIRA (*Olea europaea L.*)**

Porto Alegre

2022

Luana Souza Cavalcante

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E  
α-TOCOFEROL EM AZEITES DE OLIVA ENRIQUECIDOS COM FOLHAS DE  
OLIVEIRA (*Olea europaea L.*)**

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 Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Garavaglia

Porto Alegre

2022

© 2022

*Todos os direitos autorais reservados a Luana Souza Cavalcante. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito da autora.*

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

*Fone: (51) 98144-4081;*

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

Luana Souza Cavalcante

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E  
α-TOCOFEROL EM AZEITES DE OLIVA ENRIQUECIDOS COM FOLHAS DE  
OLIVEIRA (*Olea europaea L.*)**

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 Alimentos.

Data de aprovação: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof(a). Dr(a). Poliana Deyse Gurak – UFCSPA.

---

Prof. Dr. Ricardo Yudi Akiyoshi – UFCSPA.

Porto Alegre

2022

***Para Gustavo e João Vitor.***

## **Agradecimentos**

Aos meus irmãos, Gustavo e João Vitor, por fazerem meus dias mais felizes.

A todos os meus familiares e amigos, meus sinceros agradecimentos.

À Rachel, Gabriel, Giovanna e Samara pela amizade e companheirismo durante o curso.

Ao meu orientador Juliano, pela oportunidade de me orientar neste trabalho e em meu período de iniciação científica, com muita paciência e cuidado, trazendo mais leveza a minha jornada acadêmica.

Aos alunos bolsistas Dafne, Giovanna e Lucas, pela parceria durante a iniciação científica.

Aos técnicos laboratoriais da Central Analítica e do laboratório 317, pela cordialidade e auxílio nas análises físico-químicas.

A querida Cristiane do NUPesq, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A psicóloga Ana, pelo apoio e acolhimento.

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.

*“O certo é que não sabemos o que estamos escolhendo.  
É certeza, também, que não há certo ou errado absoluto.  
Existe apenas a vida em movimento.  
Ela nos carrega na direção indicada por nossas  
escolhas como barquinhos de papel na correnteza.  
Nessa viagem, em que o poder de controle é tão pequeno,  
mais importante que o destino, talvez seja a aventura.”*

*— Ivan Martins.*

## RESUMO

O azeite de oliva vem sendo introduzido nos hábitos alimentares em todo mundo, em função de suas múltiplas aplicações culinárias e pela presença de lipídeos de boa qualidade. No entanto, as folhas de oliveira são um subproduto da indústria do azeite, geradas em grande quantidade e pouco exploradas. As folhas são ricas em compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol, os quais possuem atividade antioxidante, relacionada a diversos benefícios à saúde e a estabilidade do próprio azeite. Este trabalho é um estudo experimental com o objetivo de avaliar a influência do enriquecimento do azeite de oliva com folhas da oliveira, em suas características físico-químicas, concentração de compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol. Foram avaliados azeites de oliva extravirgem produzidos no município de Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, enriquecidos com folhas de oliveira em duas concentrações (1% e 3%) e posterior comparação com o mesmo azeite sem adição de folhas. As amostras foram avaliadas em quatro tempos diferentes (0, 3, 6 e 12 meses) de armazenamento ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Os azeites enriquecidos com folhas de oliveira apresentaram quantidades significativamente superiores de compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol em relação ao azeite de oliva puro (sem adição de folhas), além de resultados positivos na comparação entre os índices de peróxidos e absorbância em ultravioleta, indicando atividade antioxidante e uma maior prevenção ao processo de oxidação. Logo, uma maior disponibilidade de compostos antioxidantes e benéficos à saúde, 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 introduced into eating habits around the world, due to its multiple culinary applications and the presence of good quality lipids. However, olive leaves are a by-product of the olive oil industry, generated in large quantities and little explored. The leaves are rich in phenolic compounds and alpha-tocopherol, which have antioxidant activity, related to several health benefits and the stability of the oil itself. This work is an experimental study with the objective of evaluating the influence of the enrichment of olive oil with olive tree leaves, in its physicochemical characteristics, concentration of total phenolic compounds and alpha-tocopherol. Extra virgin olive oils produced in the municipality of Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, enriched with olive leaves at two concentrations (1% and 3%) were evaluated and later compared with the same oil without the addition of leaves. The samples were evaluated at four different times (0, 3, 6 and 12 months) of storage protected from light and at room temperature. Olive oil enriched with olive tree leaves showed significantly higher amounts of phenolic compounds and tocopherols compared to pure olive oil (without the addition of leaves), in addition to positive results in the comparison between peroxide indices and ultraviolet absorbance, indicating antioxidant activity and greater prevention of the oxidation process. Therefore, a greater availability of antioxidant compounds that are beneficial to health was observed in oils enriched with olive leaves.

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

## Lista de Ilustrações

Figura 1: Área Plantada com oliveiras no RS (ha).....	17
Figura 2: Número de produtores de oliveira no Rio Grande do Sul (n).....	17
Figura 3: Frutos do cultivar 'Arbequina'.....	18
Figura 4: Consumo mundial de azeite de oliva.....	21
Figura 5: Produção de azeite de oliva no RS (Litros).....	21
Figura 6: Fábricas de azeite de oliva no RS (n).....	22
Figura 7: Fluxogramas de extração de azeite de oliva pelos métodos de prensagem e centrifugação.....	23
Figura 8: Estrutura química básica dos flavonóides.....	25
Figura 9: Estrutura química dos tocoferóis.....	27
Figura 10: Variação da Acidez Livre (%) das amostras de azeite de oliva.....	36
Figura 11: Variação do Índice de Peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg) das amostras de azeite de oliva.....	37
Figura 12: Variação de K232 das amostras de azeite de oliva.....	38
Figura 13: Variação de K270 das amostras de azeite de oliva.....	39
Figura 14: Variação da Concentração de Compostos Fenólicos Totais (mg/kg).....	41
Figura 15: Variação da Concentração de α-tocoferol (mg/kg).....	42

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Cultivo Mundial de Oliveiras em 2019.....	16
Tabela 2: Principais variedades e país de origem das oliveiras plantadas no RS (%)...18	18
Tabela 3: Parâmetros de classificação dos Azeites de Oliva.....	20
Tabela 4: Composição de macronutrientes, atividade antioxidante e teores totais de polifenóis e oleuropeína das folhas de oliveira da variedade 'Arbequina'.....	24
Tabela 5: Compostos fenólicos individuais em folhas de oliveira da variedade 'Arbequina'.....	26
Tabela 6: Avaliação da qualidade físico-química das amostras de azeite de oliva ao longo dos 12 meses de armazenamento.....	35
Tabela 7: Concentração de Compostos Fenólicos Totais e $\alpha$ -tocoferol, em mg/kg, ao longo dos 12 meses de armazenamento.....	40

## **Lista de Abreviaturas**

RS – Rio Grande do Sul.

Ha – Hectares.

min - Minutos

mL - Mililitro

L - Litros.

n - Número

s - segundos

g - Gramas

IOC – International Olive Council.

COI – Conselho Oleícola Internacional.

UE – União Europeia.

AOEV – Azeite de oliva extravirgem.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>14</b>
<b>2. Referencial Teórico</b>	<b>16</b>
2.1 Oliveira	16
2.2. A cultivar 'Arbequina'	17
2.3 Azeite de oliva	19
2.4 Folha da oliveira	23
2.5 Compostos fenólicos	25
2.6 $\alpha$ -tocoferol	26
<b>3. Justificativa</b>	<b>28</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>29</b>
4.1. Objetivo Geral	29
4.2. Objetivos Específicos	29
<b>5. Metodologia</b>	<b>30</b>
5.1 Análises Físico-químicas	31
5.1.1 Acidez Livre	31
5.1.2 Índice de peróxidos	31
5.1.3 Absorbância no Ultravioleta	32
5.2 Compostos Fenólicos Totais	32
5.3 $\alpha$ -tocoferol	33
5.4 Análise estatística	34
<b>6. Resultados e Discussão</b>	<b>34</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>43</b>
<b>8. Referências</b>	<b>44</b>

## 1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie da família botânica *Oleaceae*, encontrada atualmente em todos os continentes, em regiões de clima subtropical ou temperado<sup>1</sup>. Seus frutos, denominados azeitonas, podem ser consumidos inteiros ou usados para extração do azeite, um líquido dourado-esverdeado e aromático, utilizado desde a antiguidade como ingrediente<sup>2</sup>.

Considerado um produto complexo, o azeite de oliva é composto quase unicamente por gorduras e de 1 a 3% por outros componentes como: compostos fenólicos, hidrocarbonetos, esteróis, vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), pigmentos (clorofila e caroteno) e substâncias voláteis<sup>3,4,5</sup>. Devido aos diversos benefícios que seu consumo proporciona à saúde humana, sua produção tem crescido significativamente nos últimos anos<sup>2</sup>.

O Brasil é um importante importador deste produto, e também é um dos 10 países de maior consumo no mundo<sup>6</sup>. Entretanto, apenas 8% do azeite consumido se origina da produção interna, demonstrando o grande potencial de expansão da olivicultura no país<sup>2</sup>. Além disso, o interesse pela cultura da oliveira é impulsionado pelas regiões com aptidão edafoclimática para produção, como Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e, especialmente, Rio Grande do Sul, maior produtor de azeite de oliva no país em 2022<sup>1,2</sup>.

No Rio Grande do Sul, conforme dados do Cadastro Olivícola de 2022, houve um avanço significativo em áreas plantadas com olivais (72%) e número de produtores (121%), em comparação com o Cadastro Olivícola de 2017<sup>2</sup>. O volume de azeite de oliva produzido no estado registrou um salto de quase 390 mil litros em 5 anos, representando um crescimento de quase 700%<sup>2</sup>.

As folhas de oliveira são consideradas um subproduto da indústria do azeite de oliva, produzidas em grande quantidade e ainda pouco exploradas. Essas folhas são tradicionalmente cortadas durante a poda e utilizadas na alimentação animal ou como adubo da própria plantação<sup>6,7</sup>. Entretanto, essas folhas apresentam grande potencial de exploração devido a sua composição de compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol, encontrados inclusive em quantidades significativamente superiores em relação aos azeites<sup>8,9</sup>.

A ingestão diária de compostos fenólicos através de azeites de oliva varia em função do tipo de azeitona, estágio de maturação, produção, processo de extração do azeite, características agronômicas, entre outros. Uma boa estratégia para garantir a ingestão adequada, seria produzir azeites de oliva enriquecidos com estes compostos<sup>10</sup>.

A exploração de folhas de oliveira como matéria prima na produção de alimentos funcionais, além de resultar em produtos que contribuem para a manutenção da saúde, melhora o gerenciamento de resíduos biológicos<sup>8</sup>. Outro benefício da suplementação do azeite com folhas de oliveira, é a possibilidade de aumento da estabilidade do produto e de sua vida de prateleira<sup>11</sup>.

Com relação às formas de enriquecimento dos azeites com as folhas de oliveira, alguns métodos de manejo simples, com excelentes resultados na quantidade final de compostos fenólicos, têm sido utilizados<sup>9,12</sup>. Ainda assim, alguns estudos já avaliam as formas de extração dos compostos da folha e os principais compostos presentes, com resultados positivos<sup>17-20</sup>.

Esse fator é de grande interesse da indústria e também do consumidor, o qual será beneficiado pelo consumo de azeites com menores problemas de oxidação (processo que atua diminuindo a qualidade sensorial do produto) e com maior teor de compostos bioativos<sup>10</sup>. O que torna este projeto relevante, visto que há uma produção significativa de azeite no estado do Rio Grande do Sul.

## 2. Referencial Teórico

### 2.1 Oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie da família botânica *Oleaceae*, encontrada atualmente em todos os continentes, em regiões de clima subtropical ou temperado<sup>21</sup>. Sua origem exata não é precisa, mas há evidências de que seu descobrimento foi há mais de 6.000 anos, sendo uma das árvores frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem<sup>22-25</sup>.

A área territorial cultivada com oliveiras, cresceu mundialmente nas últimas décadas, quase quadruplicando nos últimos 50 anos<sup>26</sup>. Até 2019, registrou-se um total de 11.519,601 hectares dedicados à sua plantação e cultivo<sup>23</sup>. A Tabela 1 apresenta a área total de oliveiras cultivadas nos diferentes países produtores. A Europa é responsável por 54% dessa produção, onde encontram-se os maiores produtores de oliveira: em primeiro a Espanha, seguida por Itália e Grécia<sup>23, 27</sup>.

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	12,4	296.305	18,55	1.132.397	11,41
Europa	6.220.197	54	685.215	42,9	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.

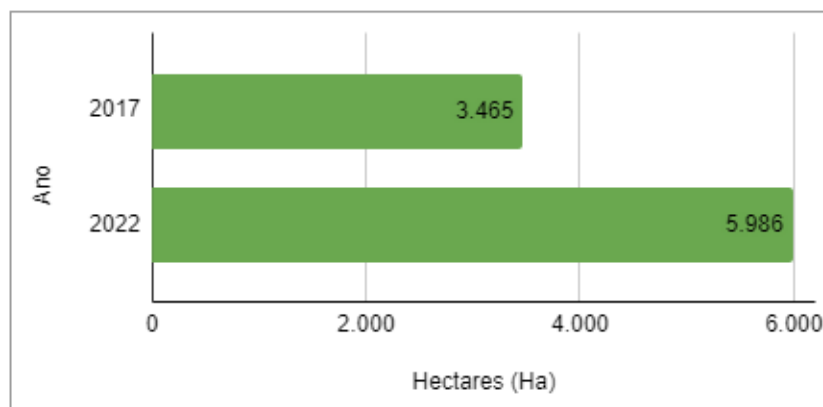
No Brasil, a olivicultura foi introduzida pelos portugueses no início do século 19, em diversas regiões do sul e sudeste. Segundo o Instituto Brasileiro de Olivicultura, a área atualmente cultivada com esta espécie em território nacional é de cerca de 10.000 ha<sup>25</sup>. O país tem como seu principal produtor o Rio Grande do Sul (RS), representando mais de 70% da área cultivada com oliveiras no país<sup>28,29</sup>.

No Rio Grande do Sul, conforme dados do Cadastro Olivícola de 2022, houve um grande incremento em áreas plantadas com olivais (Figura 1), com crescimento de 72% em 5 anos. O número de produtores (Figura 2) também cresceu



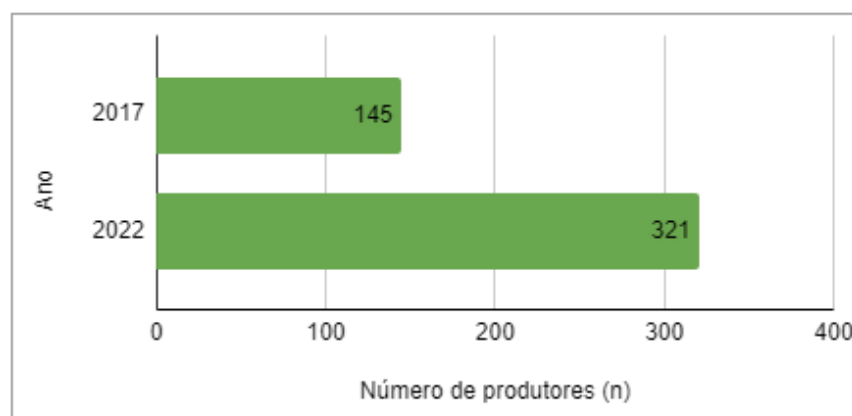
significativamente em comparação com o Cadastro Olivícola de 2017, com um aumento de 121% no mesmo período<sup>2</sup>.

Figura 1: Área Plantada com oliveiras no RS (ha).



Fonte: Cadastro Olivícola, 2022.

Figura 2: Número de produtores de oliveira no Rio Grande do Sul (n).



Fonte: Cadastro Olivícola, 2022.

Ainda conforme dados publicados pelo Cadastro Olivícola de 2022, no estado, existem 110 municípios produtores registrados. Dentre os principais cultivares encontrados no estado estão: ‘Arbequina’, ‘Koroneiki’, ‘Picual’, ‘Arbosana’ e ‘Frantoio’<sup>2</sup>.

## 2.2. A cultivar ‘Arbequina’

Espécie originária da Espanha, a cultivar ‘Arbequina’ tem se destacado pela boa adaptação em solo brasileiro<sup>30-34</sup>. Ela apresenta como características principais o

vigor vegetativo, precocidade na produção, alto rendimento em azeite e boa resistência a frio e pragas<sup>24</sup>. O azeite extraído possui baixo nível de amargor, característica sensorial bem aceita pelos consumidores. A Figura 3 apresenta as características do fruto de ‘Arbequina’.

Figura 3: Frutos do cultivar ‘Arbequina’.



Fonte: Agropecu. Catarin., Florianópolis, v.29, n.1, p.54-57, jan./abr. 2016.

Entretanto, o pequeno tamanho dos frutos dificulta a colheita mecânica<sup>24</sup>. Além disso, a baixa estabilidade do azeite produzido com esta varietal, inclina sua utilização em “blends” para equilíbrio de amargor e aumento da vida útil<sup>1</sup>.

De acordo com o Cadastro Olivícola do Rio Grande do Sul de 2022, a varietal ‘Arbequina’ pode ser encontrada em 96% dos olivais do estado. Conforme descrito na tabela 2, esta variedade é a principal espécie utilizada para a produção de azeite de oliva.

Tabela 2: Principais variedades e país de origem das oliveiras plantadas no RS (%).

Varietal	Origem	% prevalência da varietal
‘Arbequina’	Espanha	96,06
‘Koroneiki’	Grécia	90,64
‘Picual’	Espanha	56,65
‘Arbosana’	Espanha	52,22
‘Frantoio’	Itália	40,89

Fonte: Cadastro Olivícola, 2022.

## 2.3 Azeite de oliva

O azeite de oliva é o óleo obtido a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), extraído por meio de processos mecânicos ou outros meios físicos<sup>14-16,18</sup>. Sendo a principal fonte de ingestão de gordura da dieta mediterrânea<sup>7,35</sup>, ele é composto quase unicamente por gorduras e de 1 a 3% por outros componentes como: compostos fenólicos, hidrocarbonetos, esteróis, vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), pigmentos (clorofila e caroteno) e substâncias voláteis<sup>3,4,5</sup>.

Em 1959, na Espanha, foi criado o International Olive Council (IOC), uma organização intergovernamental e internacional criada para representar os países afiliados que produzem azeitona e azeite de oliva<sup>35</sup>. Esta organização é responsável por estipular parâmetros de produção, normas de qualidade, vigilância e autenticidade<sup>36</sup>, sendo um ator decisivo no desenvolvimento sustentável e responsável da olivicultura mundial.

Segundo padrões de qualidade propostos pela União Europeia, o IOC e o *Codex Alimentarius* (conjunto de padrões alimentares adotado internacionalmente), o azeite de oliva pode ser classificado em diferentes categorias comerciais, de acordo com sua qualidade. As denominações atuais são: Azeite de Oliva Extravirgem, Azeite de Oliva Virgem, Azeite de Oliva Lampante, Azeite de Oliva Refinado, Azeite de Oliva Composto e Azeite de Bagaço de Azeitona<sup>14-16</sup>.

O azeite de oliva extravirgem e o azeite de oliva virgem são os azeites de maior qualidade. O azeite de oliva lampante é o de pior qualidade, podendo ser destinado ao consumo humano apenas após processo de refino<sup>14-16</sup>. O azeite refinado é fruto de um azeite de oliva lampante e pode ser comercializado puro ou como um azeite composto<sup>14-16</sup>. O Azeite de Bagaço de azeitona é o óleo obtido por tratamento de bagaço com solventes ou tratamentos físicos, que também pode ser refinado e comercializado como composto<sup>14-16</sup>.

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 270/2005<sup>17</sup> e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de acordo com a Instrução Normativa nº 1, de 30 de janeiro de 2012<sup>18</sup> e baseados em parâmetros internacionais, conforme dados da tabela 3<sup>14-16</sup>.

Tabela 3: Parâmetros de classificação dos Azeites de Oliva.

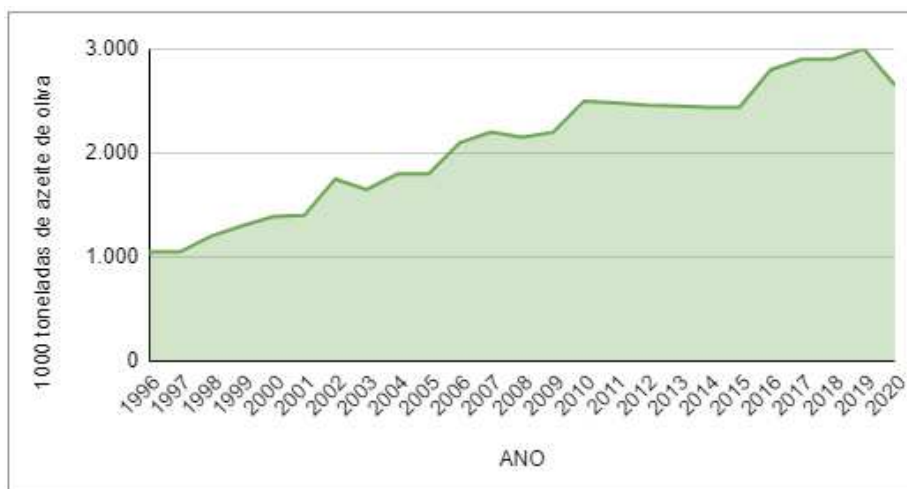
Parâmetro	Extravirgem	Virgem	Lampante
Acidez livre (%)	≤ 0,80	≤ 2,00	> 3,30
Índice de peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg)	≤ 20,0	≤ 20,0	*
K 232	≤ 2,50	≤ 2,60 *	*
K 270	≤ 0,22	≤ 0,25 *	*
ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	*
Ácido mirístico (C14:0)	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03
Ácido palmítico (C16:0)	7,50 a 20,00	7,50 a 20,00	7,50 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.

O consumo de azeite de oliva vem crescendo mundialmente nos últimos 20 anos (figura 4). Atualmente, 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<sup>23</sup>.

Figura 4: Consumo mundial de azeite de oliva.

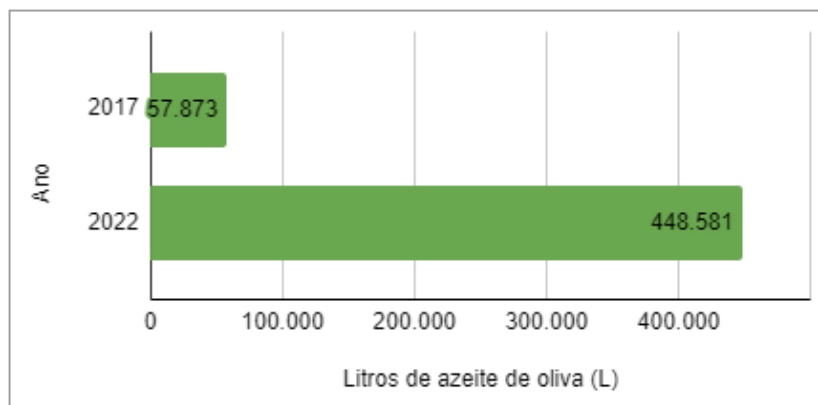


Fonte: INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (IOC), 2022.

No Brasil, o consumo anual de azeite de oliva é de 0,5 litros/habitante por ano, mas a produção nacional atende apenas 8% deste consumo, com produtos produzidos principalmente nas regiões sul e sudeste<sup>29</sup>. Sendo assim, o país é o segundo maior importador mundial, superado somente pelos Estados Unidos<sup>30</sup>. Em 2020, as importações brasileiras alcançaram 86.362 toneladas do produto<sup>30</sup>.

No Rio Grande do Sul, em 2022, registrou-se um salto de quase 390 mil litros produzidos em relação a 2017, um crescimento de quase 700%<sup>2</sup>. A produção da safra 2021/2022 totalizou 448,5 mil litros, como apresenta a figura 5<sup>2</sup>.

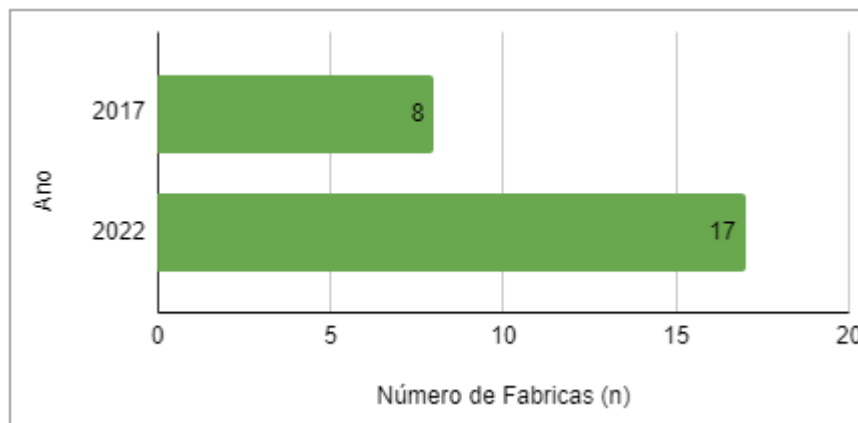
Figura 5: Produção de azeite de oliva no RS (Litros).



Fonte: Cadastro Olivícola, 2022.

Ainda, o número de fábricas produtoras de azeite de oliva no estado cresceu 112,5% em comparação a 2017, conforme apresenta a figura com dados estatísticos do Cadastro Olivícola 6<sup>2</sup>. Estas unidades são responsáveis pela introdução de 53 novas marcas comerciais de azeite de oliva extravirgem no mercado nacional<sup>2</sup>.

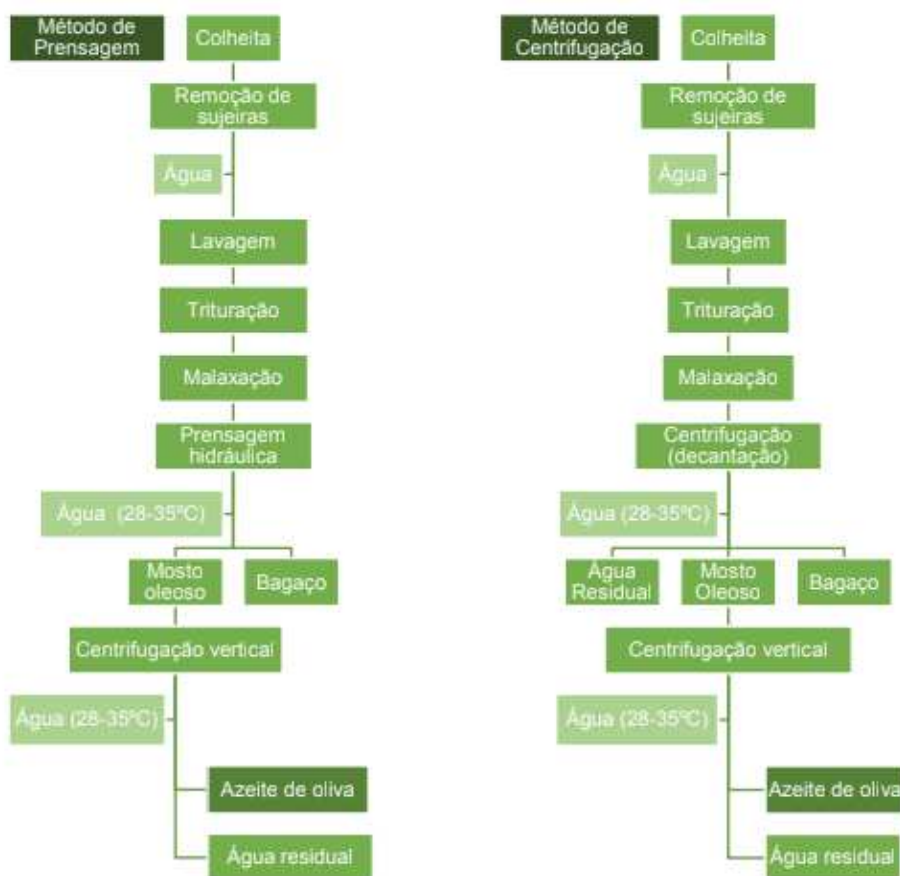
Figura 6: Fábricas de azeite de oliva no RS (n).



Fonte: Cadastro Olivícola, 2022.

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)<sup>4</sup>. Existem dois métodos para a extração do azeite, ambos livres de solventes (figura 7). O primeiro método baseia-se na prensagem mecânica da matriz de azeitonas e o segundo na centrifugação com separação trifásica da matriz<sup>4</sup>.

Figura 7: Fluxogramas de extração de azeite de oliva pelos métodos de prensagem e centrifugação.



Fonte: Boskou D, 2006.

## 2.4 Folha da oliveira

As folhas da oliveira são consideradas um subproduto da indústria oleícola, juntamente com o bagaço após a extração do azeite. Essas folhas são obtidas após a poda e/ou colheita da azeitona, sendo utilizadas em alguns casos na alimentação animal ou como fertilizante<sup>43-45</sup>. Entretanto, existe um crescente interesse no uso dessas folhas para utilização de seus compostos bioativos na área da saúde e na indústria de alimentos<sup>50-53</sup>.

A composição das folhas de oliveira pode variar dependendo de fatores como cultivar, clima, solo e estado de desenvolvimento da planta<sup>52</sup>. A Tabela 4 apresenta a composição de macronutrientes, atividade antioxidante e teores totais de polifenóis e oleuropeína das folhas de oliveira da varietal 'Arbequina', utilizadas neste

experimento. Elas foram obtidas de um cultivo orgânico localizado no município de Caçapava do Sul (RS)<sup>54</sup>.

Tabela 4: Composição de macronutrientes, atividade antioxidante e teores totais de polifenóis e oleuropeína das folhas de oliveira da varietal 'Arbequina'.

<b>Análise</b>	<b>Resultados</b>
Cinzas (g)	4,52 ± 0,06
Fibras (g)	54,08 ± 1,75
Umidade (%)	13,38 ± 0,66
Carboidratos (g)	22,42 ± 0,56
Proteínas (g)	10,18 ± 0,06
Lipídeos (g)	8,80 ± 0,56
Polifenóis Totais (g/EAG/g PS)	8,05 ± 0,03
DPPH (µmol ET/g PS)	11,95 ± 1,15
ABTS (µmol ET/g PS)	79,36 ± 1,19
Oleuropeína (mg/g)	160,76 ± 3,01

PS: peso seco. EAG: equivalente de ácido gálico. ET: equivalente Trolox.  
Dados expressos como média de 3 repetições ± desvio padrão.  
Fonte: Faccioli, 2021.

As folhas de oliveira, de maneira geral, são ricas em compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol com alto potencial antioxidante<sup>56-59</sup>, inclusive em quantidades significativamente superiores aos valores encontrados na azeitona e no azeite de oliva<sup>77-79</sup>. Em virtude dessa concentração, elas possuem uma percepção sensorial de amargor e adstringência<sup>61</sup>.

Esse sabor amargo e a sensação tátil de adstringência são provocados principalmente pelos flavonóides<sup>62</sup>. Pesquisas que utilizam o extrato da folha da oliveira são limitadas na indústria em virtude dessas características<sup>61</sup>.

Por outro lado, verifica-se efeito protetor na vida de prateleira de diversos produtos alimentícios enriquecidos com a folha da oliveira, como extrato de tomate<sup>80</sup>, linguiças<sup>81</sup>, carnes<sup>82</sup> etc., principalmente pela ação antioxidante de seus compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol. Além disso, diversos ensaios clínicos randomizados têm analisado os efeitos do extrato da folha de oliveira sobre fatores de risco cardiometabólicos em adultos<sup>63-74</sup>. Os resultados apresentaram efeitos positivos na diminuição da pressão arterial, perfil lipídico, metabolismos de glicose e



marcadores inflamatórios<sup>63-74</sup>. Nenhum ensaio determinou efeitos negativos e colaterais sobre o uso dos extratos das folhas em humanos<sup>63-74</sup>.

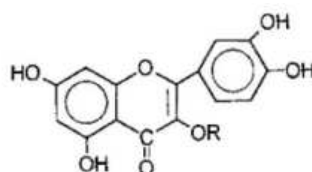
## 2.5 Compostos fenólicos

Segundo a Resolução RDC n°2 de 07 de janeiro de 2002, os compostos bioativos incluem nutrientes e substâncias não nutrientes, que possuem ação metabólica ou fisiológica específica<sup>61</sup>. O conteúdo destes compostos nos alimentos está fortemente relacionado com a capacidade antioxidante, que auxiliam na prevenção de várias doenças, devido à sua capacidade de reagir com os radicais livres<sup>61</sup>.

Dentre os compostos bioativos encontrados nas folhas de oliveira destacam-se os compostos fenólicos, os quais estão associados a à prevenção de doenças como obesidade, diabetes mellitus, hepatopatias e cânceres<sup>72</sup>. Além disso, estes compostos contribuem para um aumento na vida de prateleira dos azeites, interrompendo a reação produtora de peróxidos por inativação dos radicais livres iniciais, onde o antioxidante cede um átomo de hidrogénio a um radical do ácido graxo e transformando-se num radical fenólico, que não se propaga porque se estabiliza por ressonância<sup>75</sup>.

Os compostos fenólicos são formados pelo metabolismo secundário das plantas em condições de estresse como infecções e ferimentos, sendo essenciais para seu desenvolvimento<sup>70</sup>. Estes compostos podem ser classificados em flavonoides (figura 8) e não flavonóides. Dentre os compostos flavonóides presentes nas folhas de oliveira, destaca-se a oleuropeína e o hidroxitirosol<sup>70</sup>. Já entre os compostos não flavonóides, destacam-se os taninos.

Figura 8: Estrutura química básica dos flavonóides.



Fonte: SKERGET et al., 2005.

De acordo com a literatura, o teor de compostos fenólicos encontrados nas folhas de oliveira da varietal 'Arbequina', podem variar entre 30,2 a 236,20 mg de ácido gálico/g de matéria seca<sup>75</sup>. Apresentando uma concentração de até 18 vezes maior que o azeite de oliva puro<sup>76</sup>. A tabela 5 mostra os valores de compostos fenólicos individuais encontrados nas folhas de oliveira<sup>56</sup>.

Tabela 5: Compostos fenólicos individuais em folhas de oliveira da varietal 'Arbequina'.

<b>Compostos fenólicos</b>	<b>Resultados (mg.g<sup>-1</sup>)</b>
Apigenina	100,38 ± 13,80
Ácido hidroxibenzóico	7,74 ± 1,32
Campferol	1767,61 ± 118,96
Luteolina	40,69 ± 2,90
Luteolina	32,36 ± 4,02
Quercetina	3,48 ± 0,40
Rutina	1839,68 ± 357,45
Tirosol	9858,94 ± 375,45

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

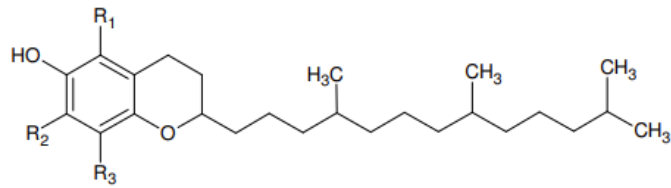
Fonte: Antunes, 2015.

## 2.6 $\alpha$ -tocoferol

Os tocoferóis fazem parte da fração insaponificável do azeite de oliva, sendo a sua presença essencial para estabilidade oxidativa do produto, em especial para evitar a oxidação de ácidos graxos insaturados<sup>99</sup>.

O termo genérico "vitamina E" é utilizado para designar diferentes compostos, nomeados  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis<sup>99</sup>. Nas folhas de oliveira, o  $\alpha$ -tocoferol é predominante, podendo atingir até 95% da composição total de tocoferóis<sup>75</sup>.

Figura 9: Estrutura química dos tocoferóis.



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	α-tocoferol
CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	β-tocoferol
H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	γ-tocoferol
H	H	CH <sub>3</sub>	δ-tocoferol

Fonte: SHAHID, 2005.

Os tocoferóis são compostos com alta atividade antioxidante que estabilizam e impedem a oxidação dos lipídeos, prevenindo a formação de peróxidos<sup>75</sup>. Durante o armazenamento dos azeites, os tocoferóis são convertidos em radicais livres, como outros antioxidantes. Estes radicais livres então se polimerizam em uma mistura de dímeros e oligômeros maiores, que passam a possuir uma atividade antioxidante moderada<sup>77</sup>.

### **3. Justificativa**

O consumo de azeite de oliva vem crescendo significativamente nas últimas décadas. Além da versatilidade gastronômica, sua composição físico-química já é relacionada cientificamente a diversos benefícios à saúde humana.

O Brasil está entre os países com maior consumo de azeite de oliva e o estado do Rio Grande do Sul, está entre os maiores produtores no país. Entretanto, o uso da folha da oliveira, um subproduto gerado em grandes quantidades, ainda é uma linha de pesquisa recente, com poucas publicações sobre o tema.

Alguns estudos já avaliaram as formas de extração dos compostos da folha e os principais constituintes presentes. Essas pesquisas vêm apresentando resultados positivos, para ambos aspectos, extração e composição. As folhas de oliveira possuem uma concentração em compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol elevada e significativamente superior ao azeite de oliva, com alto potencial antioxidante, benéfico tanto para a saúde quanto para a estabilidade do produto.

Visto que temos uma produção emergente no estado, tornam-se relevantes estudos que aproveitem esse resíduo para enriquecer alimentos. Outro fator importante deste trabalho é a geração de informações qualificadas e de livre acesso à população, a partir de um estudo relacionado com a área das ciências da saúde.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar as características físico-químicas, compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol de azeites de oliva extravirgem, enriquecidos com folhas de oliveira, produzidos a partir de azeitonas da varietal 'Arbequina', cultivadas no Rio Grande do Sul.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Classificar as amostras de azeite de oliva, como extravirgem, virgem ou lampante, de acordo com os parâmetros de identidade e de qualidade estabelecidos;
- Comparar as características físico-químicas, compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol, entre azeites de oliva puros e enriquecidos com diferentes concentrações de folha de oliveira (1 e 3%);
- Comparar as características físico-químicas, compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol, dos azeites de oliva puros e enriquecidos com folha de oliveira, ao longo do armazenamento (0, 3, 6 e 12 meses);
- Gerar informações qualificadas e de livre acesso à população, sobre a utilização das folhas de oliveira para enriquecimento do azeite de oliva.

## 5. Metodologia

Para a realização desse trabalho, foram avaliadas amostras de azeites de oliva extravirgem produzidos na safra de 2020, da varietal 'Arbequina', cultivada no estado do Rio Grande do Sul. As folhas utilizadas para enriquecimento foram selecionadas diretamente no olival, obtidas a partir de um cultivo orgânico. Posteriormente elas foram lavadas em água deionizada, sanitizadas sob imersão em solução com 1% de hipoclorito de sódio por 10 min e enxaguadas com água deionizada.

Em seguida, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de  $37 \pm 2$  °C por 48 h. Após a secagem, as folhas foram moídas em Thermomix (Vorwerk Elektrowerke GmbH & Co. KG, Mühlenweg, Alemanha), até a 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 adicionadas diretamente nas amostras de azeite de oliva.

O enriquecimento do azeite de oliva com as folhas foi realizado em duas concentrações, 1% e 3% de folhas (p/p). Essas concentrações foram escolhidas buscando limitar o sabor amargo e a sensação adstringente presente nas folhas e ainda sim apresentar possíveis benefícios à estabilidade do produto. As amostras do azeite (puro, com 1% e 3% de folhas de oliva) 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. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## **5.1 Análises Físico-químicas**

Os parâmetros físico-químicos de qualidade dos azeites de oliva, no Brasil, são avaliados pela ANVISA, através da RDC 270/2005<sup>17</sup>, pelo MAPA, através da Instrução Normativa nº 1, de 30 de janeiro de 2012<sup>18</sup> e baseados em parâmetros internacionais<sup>14-16</sup>. Neste trabalho, os parâmetros verificados foram acidez livre, índice de peróxidos, absorvância em ultravioleta a 270 nm e 232 nm. Todas as metodologias utilizadas estão de acordo com os métodos propostos pelo *Codex Alimentarius*<sup>14</sup> e pelo Conselho Oleícola Internacional (COI)<sup>16, 83-85</sup>.

### **5.1.1 Acidez Livre**

Determinada pelo método oficial do COI (T.20, Doc. N° 34, Revisão 1), a acidez livre é um dos parâmetros de qualidade mais utilizados na avaliação da qualidade do azeite de oliva e fornece informações sobre as condições do fruto antes do processamento<sup>4</sup>. Óleos obtidos de frutos saudáveis, processados logo após a colheita, tendem a apresentar valores muito baixos de acidez livre<sup>4</sup>. Um alto grau de acidez pode ser oriundo de lesões nas azeitonas, favorecendo a atividade enzimática de degradação<sup>4</sup>.

Para determinação de acidez livre, foram pesadas 3 gramas de cada amostra em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Logo após, houve a diluição da alíquota com 100 mL de solução éter:álcool (1:1) neutra. Após foi adicionado 4 gotas do indicador fenolftaleína 1% a mistura, que foi ao final homogeneizada. Em seguida, titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1M até o aparecimento da coloração rósea e de sua permanência por pelo menos 10 s. Os resultados foram expressos em percentual de ácido oleico<sup>85</sup>.

### **5.1.2 Índice de peróxidos**

Determinado pelo método oficial do COI (T.20, Doc. N° 35, Revisão 1), o Índice de peróxido (IP) reflete o início da deterioração e oxidação dos óleos<sup>92,93</sup>. Esta oxidação pode ser oriunda de más condições de armazenamento (temperatura e luz), contato excessivo do azeite com oxigênio e deterioração enzimática<sup>93</sup>.

Para determinação do índice de peróxidos foram pesadas 3 gramas de cada amostra em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se posteriormente 15 mL de ácido acético, 10 mL de clorofórmio e 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Em sequência, a mistura foi homogeneizada, tampada e mantida 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 indicador. Por fim, foi realizada a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01M até o desaparecimento da coloração azul. Os resultados foram expressos em mEq de O<sub>2</sub>/kg<sup>84</sup>.

### 5.1.3 Absorbância no Ultravioleta

Determinada pelo método oficial do COI (T.20, Doc. N° 19, Revisão 4), a extinção específica no ultravioleta é um parâmetro que avalia o grau de oxidação do azeite de oliva, através da determinação da absorbância nos comprimentos de onda correspondentes às máximas absorções dos dienos e trienos conjugados (232 nm e 270 nm, respectivamente). Tais compostos são formados a partir de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados no processo de oxidação e/ou prática de refino<sup>4, 83</sup>.

Para determinação da extinção específica foram elaboradas duas soluções com diferentes quantidades das amostras (A=0,25 g e B=0,05 g) em balões volumétricos de 25 mL. Após, adicionou-se ciclohexano até a marca volumétrica, seguido de homogeneização. As soluções tiveram a absorbância aferida nos seguintes comprimentos de onda: solução A em 266 nm, 270 nm e 274 nm; e solução B, 232 nm. Foi utilizado um espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV), modelo UV-1800 da marca Shimadzu, e um solvente puro como referência para aferição. A partir dos resultados obtidos foram calculados os parâmetros K232, K270 e delta K<sup>83</sup>.

## 5.2 Compostos Fenólicos Totais

Foi utilizado para determinação dos compostos fenólicos totais o método proposto por Vázquez-Roncero (1973)<sup>87</sup>. Inicialmente, foram pesadas 5 g de cada amostra 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 de



250 mL e adicionada de 10 mL de uma solução metanol:água (60:40) e agitada por 5 minutos em mesa agitadora orbital (IKA, modelo KS130, Staufen, Alemanha). Após, houve a decantação e separação das fases líquidas, e a coleta da fase contendo a solução metanol:água (60:40). A adição de 10 mL de solução de metanol:água (60:40), agitação e decantação foi repetida 3 vezes. O extrato final, contendo todas as repetições de extração, foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água ultra pura e, então, homogeneizado.

Posteriormente, em um balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 2,5 mL do extrato obtido, 17,5 mL de água ultrapura e 1,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). A solução foi homogeneizada manualmente e permaneceu em repouso por 3 minutos. Na sequência, adicionou-se 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 e armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 45 min. A absorbância da solução foi medida no comprimento de onda 725 nm em espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV), da marca Shimadzu, modelo UV-1800. A partir da leitura espectrofotométrica das amostras e da curva padrão elaborada com seis diferentes concentrações de ácido cafeico, foram calculados os compostos fenólicos totais. Os resultados foram expressos como mg de ácido cafeico/Kg de azeite.

### 5.3 $\alpha$ -tocoferol

O  $\alpha$ -tocoferol foi avaliado seguindo a normativa internacional ISO 9936 (2006)<sup>88</sup>, utilizando a cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC). Inicialmente, foram pesadas 0,8 g das amostras de azeite de oliva, em um balão volumétrico de 10 mL. Posteriormente, foi adicionado *n*-hexano completando o volume do balão, seguido de homogeneização. As amostras foram filtradas em membranas de 0.22  $\mu$ m e transferidas para o vial de injeção.

Para a análise no HPLC, a fase móvel foi preparada com 0,5% de propan-3-ol em hexano (v/v). Foi utilizada a coluna (Phenomenex, Lichrospher Sil 60) com fase C:18 (octadecyl) de 250 x 4 mm x 5. O forno acoplado 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.

Injetou-se 20 µL de cada uma das amostras. O α-tocoferol foi identificado por comparação com o tempo de retenção de cada um dos padrões utilizados. A construção da curva foi realizada com 05 diferentes concentrações do α-tocoferol.

#### **5.4 Análise estatística**

Todos os dados, obtidos em triplicata, foram analisados por análise de variância (ANOVA) mista de medidas repetidas e teste de comparações múltiplas Sidak, com resultados relatados como média ± erro padrão. O teste Sidak ajusta o nível de significância para comparações múltiplas e fornece limites mais apertados em comparação a outros testes. Os grupos foram comparados entre si e apenas o valor F com  $p < 0,05$  foi considerado significativo. O software utilizado nas análises foi o SPSS versão 25.

## 6. Resultados e Discussão

Os parâmetros de qualidade físico-química analisados (acidez livre, índice de peróxidos e absorvância no ultravioleta), estão descritos na tabela 6. Os resultados obtidos foram comparados com os dados encontrados na literatura sobre o enriquecimento de azeites de oliva com folhas de oliveira. Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol estão descritos na tabela 7, sendo posteriormente comparados à literatura.

Tabela 6: Avaliação da qualidade físico-química das amostras de azeite de oliva ao longo dos 12 meses de armazenamento.

% de folhas	Tempo de arm. (meses)	Índice de Acidez (% ác. oleico)	Índice de Peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg)	K232	K270	Delta K
Limites de tolerância*		≤0,8 - AOEV	≤20 - AOEV	≤2,5 - AOEV	≤0,22 - AOEV	≤0,01 - AOEV
0% (Puro)	0	0,45 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,95 ± 0,00 <sup>bC</sup>	1,93 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>bA</sup>	0,00
	3	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,98 ± 0,14 <sup>bC</sup>	2,09 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>aB</sup>	0,00
	6	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,79 ± 0,09 <sup>bB</sup>	2,06 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>abB</sup>	0,00
	12	0,48 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,95 ± 0,04 <sup>aA</sup>	2,08 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>aA</sup>	0,00
1%	0	0,45 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,98 ± 0,00 <sup>dB</sup>	1,93 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>cA</sup>	0,00
	3	0,45 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,62 ± 0,14 <sup>cB</sup>	2,23 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>aA</sup>	0,00
	6	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,41 ± 0,09 <sup>bA</sup>	2,03 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>bA</sup>	0,00
	12	0,47 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,98 ± 0,04 <sup>aA</sup>	1,92 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>abA</sup>	0,00
3%	0	0,45 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,99 ± 0,00 <sup>bA</sup>	1,93 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>bA</sup>	0,00
	3	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,74 ± 0,14 <sup>aA</sup>	2,02 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>aA</sup>	0,00
	6	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,78 ± 0,09 <sup>aA</sup>	1,86 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>bC</sup>	0,00
	12	0,47 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,80 ± 0,04 <sup>aA</sup>	2,11 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>bB</sup>	0,00

Médias que compartilham letras minúsculas não diferem entre si quanto ao tempo (teste de Sidak p>0.05)

Médias que compartilham letras maiúsculas não diferem entre si quanto ao grupo (teste de Sidak p>0.05)

Valores expressos em média ± erro-padrão / AOEV - Azeite de oliva extra virgem

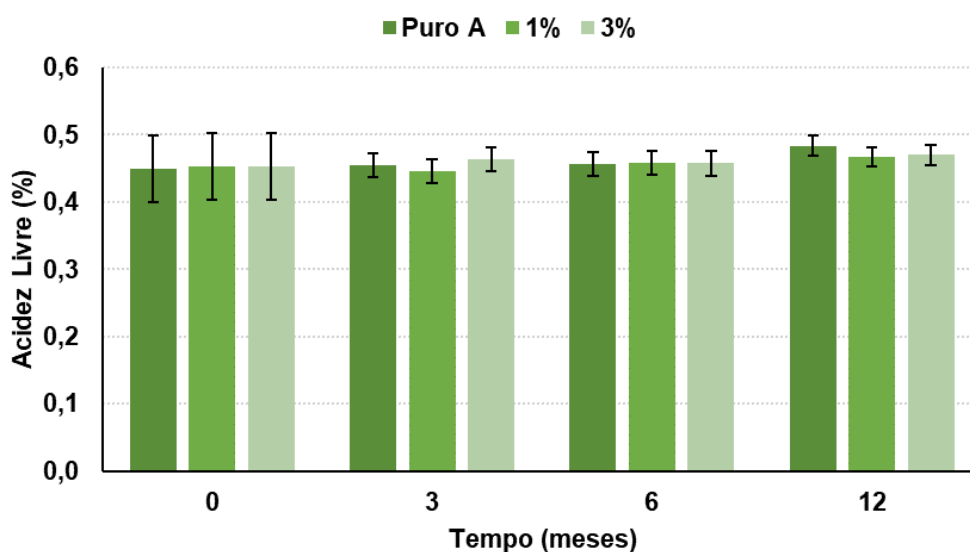
\*Conforme limites expressos na Instrução Normativa nº 01 de 2012, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Fonte: Autoral.

A figura 10 representa a variação da acidez livre das amostras analisadas ao longo dos 12 meses de armazenamento. A variação da amostra pura inicialmente foi de 0,45% aumentando para 0,49% ao final do estudo, enquanto as variações das

amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas foi de 0,45% para 0,47% em ambas. Todas as amostras se mantiveram dentro do limite de tolerância para classificação de extravirgem<sup>14-18</sup>. As amostras não mostraram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) e ao longo do tempo, entretanto as amostras enriquecidas apresentaram uma atividade antioxidante inicial.

Figura 10: Variação da Acidez Livre (%) das amostras de azeite de oliva.



Fonte: Autoral.

Kiritsakis et al. (2017) determinaram o efeito do extrato aquoso de folha de oliveira no conteúdo fenólico total, atividade antioxidante, composição e parâmetros de qualidade do azeite de oliva<sup>89</sup>. 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%<sup>89</sup>.

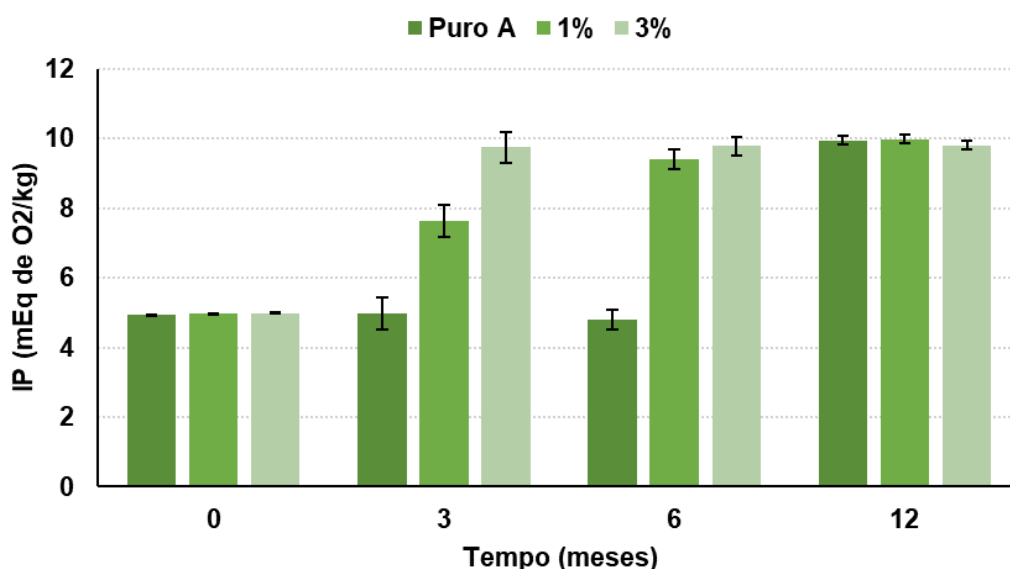
Tarchoune et al. (2019), avaliou os efeitos da adição de folha de oliveira (0 e 3%) sobre os principais antioxidantes e a atividade antioxidante dos azeites Neb Jmel e Oueslati<sup>90</sup>. A acidez livre do azeite Neb Jmel não mostrou diferenças significativas entre a amostra pura e enriquecida (0,56%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

Malheiro et al. (2011), realizou um estudo 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%)<sup>91</sup>. A acidez livre apresentou diferenças significativas em todas as amostras. 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<sup>91</sup>.

A figura 11 representa a variação do índice de peróxidos das amostras analisadas ao longo dos 12 meses de armazenamento. A variação da amostra pura inicialmente foi de 4,95 mEq O<sub>2</sub>/kg, aumentando para 9,95 mEq O<sub>2</sub>/kg ao final do estudo, enquanto as variações das amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas foram de 4,98 mEq O<sub>2</sub>/kg para 9,98 mEq O<sub>2</sub>/kg e 4,99 mEq O<sub>2</sub>/kg para 9,80 mEq O<sub>2</sub>/kg, respectivamente. Todas as amostras mantiveram-se dentro do limite de tolerância para classificação de extravirgem ( $\leq 20,0$  mEq O<sub>2</sub>/kg)<sup>14-18</sup>. As amostras apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de peróxidos ao longo do tempo de armazenamento.

Figura 11: Variação do Índice de Peróxidos (mEq O<sub>2</sub>/kg) das amostras de azeite de oliva.



Fonte: Autoral.

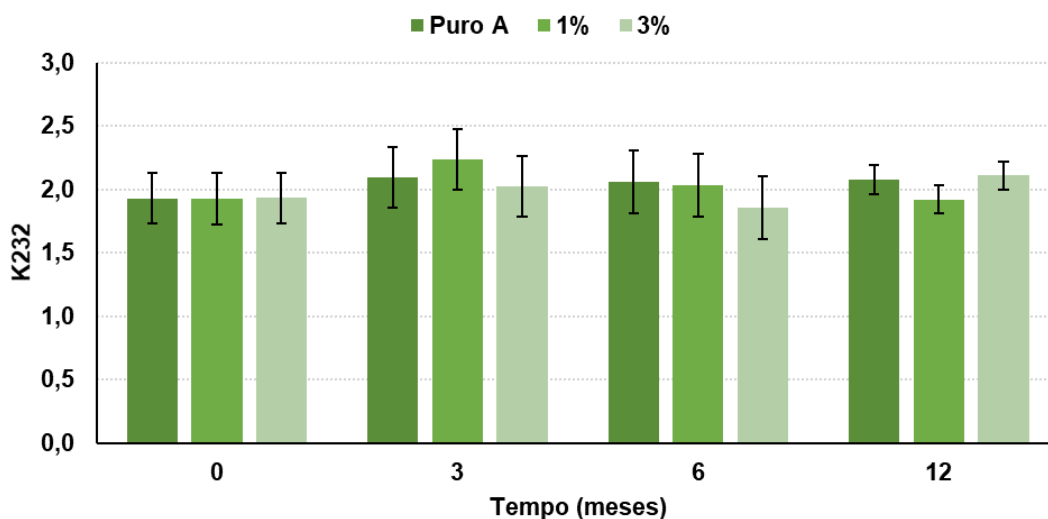
No estudo de Kiritsakis et al. (2017), o índice de peróxidos apresentou diferença significativa da amostra pura (9,62 mEq O<sub>2</sub>/kg) para a amostra enriquecida

(9,28 mEq O<sub>2</sub>/kg)<sup>89</sup>. Tarchoune et al. (2019) não encontraram diferenças significativas 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)<sup>90</sup>.

Malheiro et al. (2011) encontraram 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)<sup>91</sup>.

Conforme a figura 12, a variação de K232 da amostra pura foi de 1,93 no tempo 0, para 2,08 no décimo segundo mês. Já as variações das amostras com 1% e 3% de folhas foram de: 1,93 para 1,92 e 1,93 para 2,11, respectivamente. Comparando as amostras entre si, nenhuma amostra apresentou diferenças significativas ao término do estudo.

Figura 12: Variação de K232 das amostras de azeite de oliveira.

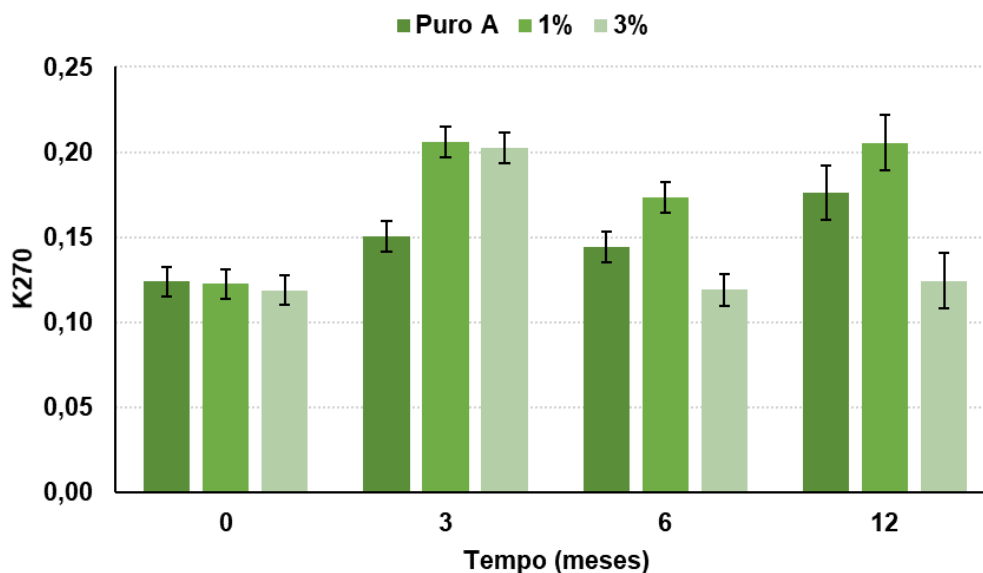


Fonte: Autoral.

Conforme a figura 13, a variação de K270 da amostra pura foi de 0,12 no tempo 0, para 0,18 no décimo segundo mês. Já as variações das amostras com 1% e 3% de folhas foram de 0,12 para 0,21 e 0,12 para 0,12, respectivamente. As amostras apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ) e ao longo do

tempo.

Figura 13: Variação de K270 das amostras de azeite de oliva.



Fonte: Autoral.

Kiritsakis et al. (2017) encontraram diferença significativa nos valores de K232 em seu estudo, sendo que 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<sup>89</sup>. Malheiro et al. (2011) também encontraram 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<sup>91</sup>.

Ainda, Kiritsakis et al. (2017) encontraram 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<sup>89</sup>. Malheiro et al. (2011) também encontraram 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), observando-se que as amostras enriquecidas apresentaram diferenças significativas entre si, com exceção das amostras com 1% e 2,5% de adição de folhas<sup>91</sup>.

A tabela 7 apresenta a concentração de compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol das amostras de azeite de oliva analisadas ao longo dos 12 meses de armazenamento.

Tabela 7: Concentração de Compostos Fenólicos Totais e  $\alpha$ -tocoferol, em mg/kg, ao longo dos 12 meses de armazenamento.

% de folhas	Tempo de arm. (meses)	Fenólicos Totais (mg/Kg)	$\alpha$ -tocoferol (mg/Kg)
<b>0% (Puro)</b>	0	885,73 $\pm$ 6,97 <sup>aB</sup>	348,25 $\pm$ 1,09 <sup>aC</sup>
	3	446,39 $\pm$ 9,27 <sup>bB</sup>	340,72 $\pm$ 1,27 <sup>bA</sup>
	6	424,30 $\pm$ 4,97 <sup>bC</sup>	269,10 $\pm$ 1,00 <sup>cC</sup>
	12	388,14 $\pm$ 15,82 <sup>bB</sup>	241,38 $\pm$ 1,18 <sup>dC</sup>
<b>1%</b>	0	904,72 $\pm$ 6,97 <sup>aB</sup>	378,42 $\pm$ 1,09 <sup>aB</sup>
	3	469,78 $\pm$ 9,27 <sup>bB</sup>	349,03 $\pm$ 1,27 <sup>bA</sup>
	6	484,74 $\pm$ 4,97 <sup>bB</sup>	325,38 $\pm$ 1,00 <sup>cB</sup>
	12	391,46 $\pm$ 15,82 <sup>bB</sup>	318,71 $\pm$ 0,18 <sup>cB</sup>
<b>3%</b>	0	994,77 $\pm$ 6,97 <sup>aB</sup>	398,21 $\pm$ 1,09 <sup>aA</sup>
	3	757,44 $\pm$ 9,27 <sup>bA</sup>	343,02 $\pm$ 1,27 <sup>bA</sup>
	6	689,27 $\pm$ 4,97 <sup>cB</sup>	340,51 $\pm$ 1,00 <sup>bA</sup>
	12	599,62 $\pm$ 15,82 <sup>cB</sup>	337,29 $\pm$ 1,18 <sup>bA</sup>

Médias que compartilham letras minúsculas não diferem entre si quanto ao tempo (teste de Sidak  $p > 0.05$ )

Médias que compartilham letras maiúsculas não diferem entre si quanto ao grupo (teste de Sidak  $p > 0.05$ )

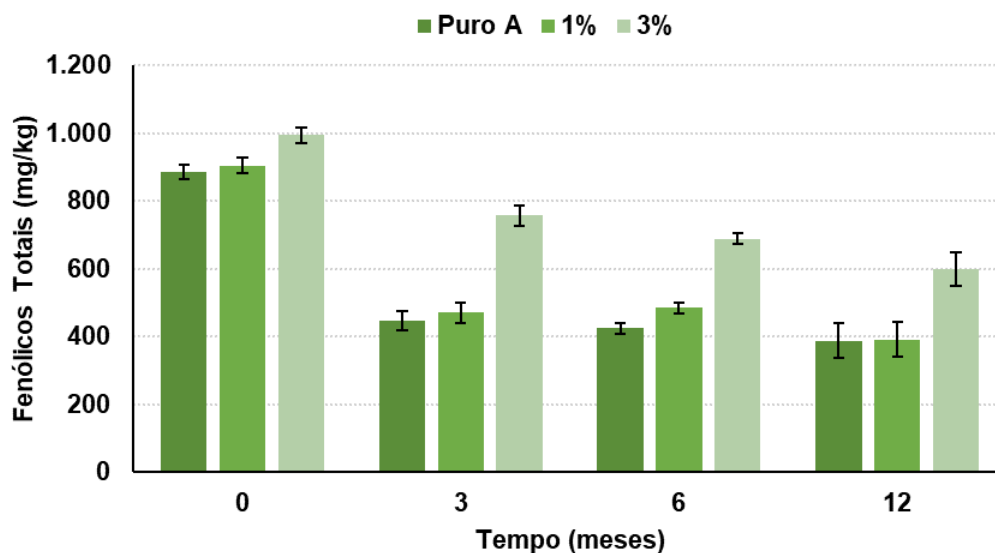
Valores expressos em média  $\pm$  erro-padrão

Fonte: Autoral.

A figura 14 representa a variação da concentração de compostos fenólicos totais das amostras de azeite de oliva analisadas. A variação da amostra pura foi de 885,73 mg/kg para 388,14 mg/kg ao final do estudo, enquanto as amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas foram de 904,72 mg/kg para 391,46 e 994,77 mg/kg para 599,62, 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.



Figura 14: Variação da Concentração de Compostos Fenólicos Totais (mg/kg).



Fonte: Autoral.

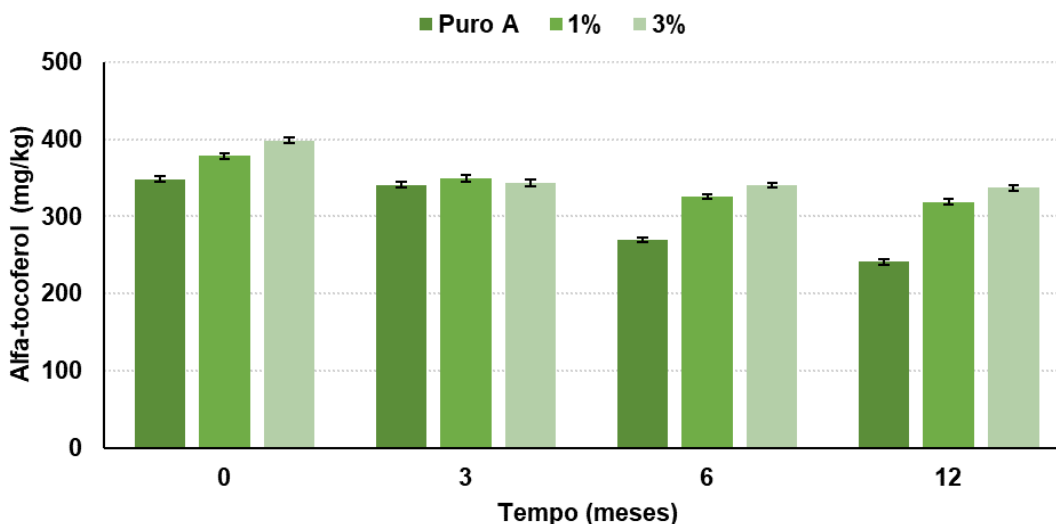
Salta et al. (2017) avaliaram o efeito do enriquecimento de óleos comercialmente disponíveis (azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de palma e gordura vegetal) com o extrato da folha da oliveira<sup>98</sup>. O aumento da concentração de compostos fenólicos totais do azeite de oliva foi de 103% (de 94 mg/kg para 299 mg/kg)<sup>98</sup>.

Sahin et al. (2017) encontraram um aumento de quase duas vezes no valor de compostos fenólicos totais em relação ao azeite puro<sup>94</sup>. Kiritsakis et al. (2017) encontraram diferença significativa entre o azeite de oliva enriquecido com o extrato da folha da oliveira em relação ao azeite puro<sup>91</sup>. 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)<sup>90</sup>.

A figura 15 representa variação da concentração de  $\alpha$ -tocoferol das amostras analisadas ao longo dos 12 meses deste estudo. A variação da amostra pura foi de 348,25 mg/kg para 241,38 mg/kg, enquanto a variação das amostras enriquecidas com 1% e 3% de folhas de oliveira foi de 378,42 mg/kg para 318,71 mg/kg e 398,21 mg/kg para 337,28 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  $\alpha$ -tocoferol das amostras enriquecidas foi superior à amostra pura.

Figura 15: Variação da Concentração de  $\alpha$ -tocoferol (mg/kg).



Fonte: Autoral.

Sahin et al. (2017) mostraram em seus resultados que a concentração de  $\alpha$ -tocoferol da amostra pura foi de 114,38 ppm, e o da amostra enriquecida foi de 127,83 ppm<sup>94</sup>. Não houve discussão acerca de diferenças significativas no estudo, entretanto, é perceptível que a concentração da amostra enriquecida é superior ao da amostra pura<sup>94</sup>.

Tarchoune et al. (2019) encontraram diferença significativa na concentração de  $\alpha$ -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<sup>90</sup>. Malheiro et al. (2011) encontraram 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<sup>91</sup>.

## 7. Conclusão

Este trabalho avaliou a influência do enriquecimento de azeites de oliva produzidos no Rio Grande do Sul, com folhas de oliveiras da varietal 'Arbequina', nas características físico-químicas, compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol. Todos os azeites apresentaram bons níveis de qualidade, estando de acordo com os parâmetros estabelecidos para classificação de extravirgem durante todo o período de armazenamento.

Analisando os principais indicativos de oxidação dos azeites (parâmetros físico-químicos) foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre os índices da amostra pura e das amostras enriquecidas com folhas de oliveira (1% e 3%). A ação da folha apresentou níveis iniciais de prevenção a oxidação dos azeites ao longo do armazenamento.

Analisando os parâmetros de compostos fenólicos totais e  $\alpha$ -tocoferol, as amostras enriquecidas apresentaram valores significativamente superiores ao azeite puro no final do período de estudo. Esses compostos desempenham um importante papel na saúde humana e contra o processo oxidativo, devido às suas propriedades antioxidantes.

Assim, a utilização da folha da oliveira para enriquecimento do azeite de oliva pode ser considerada uma maneira natural de melhorar sua funcionalidade e vida útil. Entretanto, apesar dos resultados promissores, mais pesquisas devem ser realizadas, em termos de concentrações, tempo de armazenamento e diferentes variedades.

É esperado que novos parâmetros de pesquisa possam ser avaliados a partir deste trabalho, como: atividade antioxidante, análise sensorial, aceitação e desenvolvimento de um novo produto. Acredita-se que com tais trabalhos subsequentes sejam alcançadas maior confiabilidade e segurança na conclusão das hipóteses iniciais.

## 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>. Acesso em: 24/09/2022.
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 controle 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, Trichopoulou 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 N° 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. Ministérios da agricultura, pecuária e desenvolvimento. Instrução normativa n° 1, de 30 de janeiro de 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, Labuz-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. Vlavcheski 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, Hadrach 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 europaea* 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 la. 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 la, 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.