

Infusões de folha de oliveira cv. Santulhana: Seleção de condições para aumento da bioatividade

Ellen da Silva Costa

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com o Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca - CEFET/RJ

Orientada por

Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Doutor Nuno Miguel de Sousa Rodrigues

Profa. Doutora Alba Regina Pereira Rodrigues

Bragança

2020

À minha mãe
Às minhas irmãs

Agradecimentos

Ao entregar este trabalho, é com enorme prazer que agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para a sua realização e conclusão.

Ao meu orientador Professor Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária, pela sugestão do tema do trabalho, orientação, disponibilidade e incentivo.

Ao meu coorientador Doutor Nuno Rodrigues, por todo conhecimento transmitido, pelo incentivo, disponibilidade na orientação, empenho, ajuda nos trabalhos práticos e pela paciência.

À minha Coorientadora, Alba Regina Pereira Rodrigues, por sempre estar disponível, pelas sugestões, pela prontidão nas correções e total colaboração.

À Professora Doutora Elsa Ramalhosa, da Escola Superior Agrária, pela ajuda e disponibilidade, pelos ensinamentos prestados e apoio para a realização deste trabalho.

A todos os que durante este tempo, partilharam comigo o laboratório, contribuindo para a realização das análises para que esse trabalho fosse concluído.

Às minhas amigas e colegas de Mestrado, Iasmin Ferreira, Karinne Novaes e Lidiane Moura, por toda ajuda, incentivo, paciência e por partilhar esse período importante comigo.

Agradeço também, às minhas amigas Fernanda Azevedo e Marina Nóbrega pelo companheirismo prestado durante todo esse período académico, por todo carinho, incentivo e atenção. E a todos os outros amigos contribuíram de alguma maneira para que esse trabalho fosse realizado.

À minha prima, Bárbara Oliveira por toda a paciência e disposição em momentos de ansiedade, por me ouvir nos momentos de desânimo, pelo incentivo para a continuação e conclusão deste trabalho.

À minha família, pelo apoio e entendimento de todos os fatores, para que essa dissertação se concretizasse.

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria para sempre seguir em frente. Pela realização e concretização nesse sonho, por sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho e que me encorajam a prosseguir.

Por fim, à minha mãe e irmãs, por todo esforço realizado para que esse mestrado fosse concluído, mesmo com a distância e toda saudade durante esse período de estudo, pelo apoio económico, pela força, pelo constante incentivo, pelo carinho prestado ao longo de toda a minha vida académica e pelo seu amor.

Resumo

Nas últimas décadas, face às mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores com maior preocupação pela ingestão de alimentos benéficos para a saúde humana, é necessário encontrar fontes alternativas de produtos de origem natural ricos em compostos capazes de beneficiar o organismo humano. Assim sendo, os géneros alimentícios ricos em compostos antioxidantes têm tido uma atenção particular, destacando-se os de origem natural e seus subprodutos.

Em Portugal, especificamente em Trás-os-Montes, pela importância que a oliveira tem a nível regional, é dada particular atenção aos seus produtos. As folhas de oliveira, resultantes do processo da colheita da azeitona e da poda da planta, são subprodutos existentes em abundância sendo uma matriz que deve ser valorizada. Assim, o presente trabalho teve por objetivo selecionar as condições de preparação de infusões de folhas de oliveira, ao nível de quantidade de folha e temperatura utilizada, que melhor potenciem o seu teor em antioxidantes e suas características sensoriais. Utilizaram-se folhas de oliveira da cv. Santulhana por ser abundante na região. Para tal, foram preparadas infusões com três concentrações diferentes (1, 2, 3g/200mL) e cinco temperaturas (60, 70, 80, 90 e 100°C) e procedeu-se à determinação do perfil fenólico por HPLC/DAD, avaliação do efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH, atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}, capacidade redutora total e poder redutor. Em paralelo, foi feita a análise dos diferentes grupos fenólicos, perfil dos compostos voláteis, taninos hidrolisáveis e a análise sensorial.

Na caracterização do perfil fenólico, foram identificados e quantificados oito compostos fenólicos, sendo eles, hidroxitirosol glicol, ácido clorogénico, ácido cafeico, verbascosídeo, oleuropeína, rutina, apigenina-7-*O*-glucósido e luteolina, tendo a oleuropeína como composto mais abundante, seguido do verbascosídeo e ácido cafeico. Na avaliação da atividade antioxidante, pelo método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, os valores em percentagem de inibição ficaram compreendidos entre 86 e 90%, estando os maiores valores ligados as infusões de maior concentração, porém não foi observada uma relação direta entre os parâmetros utilizados para o preparo. O poder redutor aumentou diretamente com a temperatura de extração.

Sensorialmente, as infusões preparadas com 3g de folhas apresentaram valores com maior intensidade em relação aos atributos avaliados (aspecto visual, aroma e paladar), comparativamente as demais concentrações. O fator persistência, obteve destaque nas infusões de 2 e 3g, e percebeu-se que o amargor foi menos intenso nas infusões com 1g de folha e mais intenso nas infusões preparadas com 3g. Observou-se que as diferentes temperaturas empregadas na preparação das infusões teve pouca influência nas características sensoriais relacionadas a turbidez, agradabilidade do aroma, persistência, picante e adstringência, pelo contrário as concentrações de folhas apresentaram influência marcante na maior parte dos atributos.

Na avaliação dos compostos voláteis, analisado por cromatografia gasosa-espectrometria de massa, identificaram-se 11 compostos majoritários, sendo eles, isoctano, etanoato de butilo, 2-metil-1-butil acetato, acetato de hexilo, m-cimeno, D-limoneno, eucaliptol, linalol, cânfora, hexanoato de butilo e decanal, tendo o acetato de hexilo como composto majoritário e o decanal como minoritário.

Verificou-se que a variação nas formas de preparação das infusões, como as diferentes concentrações e temperaturas utilizadas influenciaram no perfil fenólico, na atividade antioxidante, no perfil volátil e na sensorial das infusões. Com os resultados obtidos, foi concluído que a melhor combinação dos fatores de preparação para a obtenção de uma bebida com elevada atividade antioxidante e agradabilidade sensorial para os consumidores, consiste no uso de 1g de folhas de oliveira da cv. Santulhana a 100°C, tendo sido a análise sensorial um dos fatores decisivos na obtenção da melhor combinação.

Palavras-chave: Folhas de oliveira; infusões; atividade antioxidante; compostos fenólicos; compostos voláteis; avaliação sensorial; temperatura; concentração

Abstract

In recent decades, in the face of changes in the eating habits of consumers with greater concern for the intake of foods beneficial to human health, it is necessary to find alternative sources of products of natural origin rich in compounds capable of benefiting the human body. Therefore, foodstuffs rich in antioxidant compounds have received particular attention, especially those of natural origin and their by-products.

In Portugal, specifically in Trás-os-Montes, due to the importance of olive trees at regional level, particular attention is paid to their products. Olive leaves, resulting from the process of harvesting the olives and pruning the plant, are by-products in abundance and are a matrix that should be valued. Thus, the present work aimed at selecting the conditions for the preparation of olive leaf infusions, at the level of leaf quantity and temperature used, that best enhance their antioxidant content and their sensory characteristics. Olive leaves from cv. Santulhana were used because they are abundant in the region. For this, infusions were prepared with three different concentrations (1, 2, 3g/200mL) and five temperatures (60, 70, 80, 90 and 100°C) and the phenolic profile was determined by HPLC/DAD, evaluation of the DPPH radical-scavenging capacity, ABTS•+ radical cation-scavenging capacity, total reducing capacity and reducing power. In parallel, the analysis of the different phenolic groups, volatile compounds profile, hydrolysable tannins and sensory analysis were performed.

In the characterization of the phenolic profile, eight phenolic compounds were identified and quantified, being hydroxytyrosol glycol, chlorogenic acid, caffeic acid, verbascoside, oleuropein, rutin, apigenin 7-O-glucoside and luteolin, having oleuropein as the most abundant compound, followed by the verbascoside and caffeic acid. In the evaluation of the antioxidant activity, using the DPPH scavenging capacity assay, the values in inhibition percentage were between 86 and 90%, with the highest values linked to the highest concentration infusions, but a direct relationship was not observed between the parameters used for the preparation. The reducing power increased directly with the extraction temperature.

Sensorially, the infusions prepared with 3g of leaves presented values with greater intensity in relation to the evaluated attributes (visual aspect, aroma and taste), compared to the other concentrations. The persistence factor was highlighted in the infusions with 2 and 3g, and it was noticed that the bitterness was less intense in the infusions with 1g of leaf and more intense in the infusions prepared with 3g. It was observed that the different temperatures used in the preparation of the infusions had little influence on the sensory characteristics related to turbidity, pleasantness of the aroma, persistence, spiciness and astringency; on the contrary, the leaf concentrations have a marked influence on most of the attributes.

In the evaluation of volatile compounds, analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, 11 major compounds were identified, isooctane, butyl ethanoate, 2-methyl-1-butyl acetate, hexyl acetate, m-cymene, D-limonene, eucalyptol, linalool, camphor, butyl hexanoate and decanal, with hexyl acetate as the major compound and decanal as the minor.

It was found that the variation in the forms of preparation of infusions, as the different concentrations and temperatures used influenced the phenolic profile, the antioxidant activity, the volatile profile and the sensory of infusions. With the results obtained, it was concluded that the best combination of preparation factors to obtain a beverage with high antioxidant activity and sensory enjoyment for consumers consists in the use of 1g of olive leaves of cv. Santulhana at 100°C, and sensory analysis was one of the decisive factors in obtaining the best combination.

Keywords: Olive leaves; infusions; antioxidant activity; phenolic compounds; volatile compounds; sensory evaluation; temperature; concentration

Índice

Resumo.....	iii
Abstract	v
1. Introdução	2
2. Revisão bibliográfica	6
2.1. A oliveira (<i>Olea europaea</i> L.).....	6
2.2. Folhas de oliveira	7
2.2.1. Propriedades biológicas da folha de oliveira	8
2.2.2. Composição fenólica das folhas de oliveira.....	10
2.3. Inovação no setor de infusões	17
2.4. Folhas de oliveira no âmbito da indústria agroalimentar	19
2.5. Infusões	20
2.5.1. Fatores que influenciam na qualidade das infusões.....	21
3. Materiais e métodos.....	24
3.1. Amostras.....	24
3.2. Preparação das infusões/extratos.....	24
3.3. Caracterização das infusões de folhas de oliveira da cv. Santulhana e sua atividade biológica.....	24
3.3.1. Determinação do perfil fenólico por HPLC/DAD	25
3.3.2. Avaliação da capacidade redutora total	25
3.3.3. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	26
3.3.4. Determinação do Poder Redutor	26
3.3.5. Diferentes grupos fenólicos	27
3.4. Caracterização sensorial, fração volátil e taninos hidrolisáveis de infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana	27
3.4.1. Análise sensorial	27
3.4.2. Perfil dos compostos voláteis.....	27
3.4.3. Taninos hidrolisáveis	28

3.5. Análise estatística	29
4. Resultados e discussão.....	31
4.1. Rendimento de extração	31
4.2. Determinação do perfil fenólico	32
4.3. Atividade antioxidante das folhas de oliveira da cv. Santulhana	38
4.3.1. Capacidade redutora total	38
4.3.2. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	41
4.3.3 Atividade sequestradora do radical (ABTS ^{•+}).....	42
4.3.4. Determinação do poder redutor	44
4.3.4 Diferentes grupos fenólicos	46
4.4. Caracterização sensorial, fração volátil e taninos hidrolisáveis de infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana	49
4.4.1. Análise sensorial.....	49
4.4.2. Perfil de compostos voláteis	53
4.4.3. Taninos hidrolisáveis	57
5. Conclusão	61
6. Referências bibliográficas	64
ANEXO I.....	78
ANEXO II.....	80

Índice de Figuras

Figura 1: Oliveiras da cv. Santulhana.....	6
Figura 2: Cromatogramas (HPLC) do perfil fenólico das infusões de folha de oliveira. Detecção a 254 nm: (A) Infusão a 60°C; (B) Infusão a 70°C; (C) Infusão a 80°C; (D) Infusão a 90°C; (E) Infusão a 100°C; (1) hidroxitirosol glicol; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Verbascosídeo; (5) Oleuropeína; (6) Rutina; (7) Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido; (8) Luteolina.	32
Figura 3: Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS das folhas de oliveira (A) Concentração 1g em 200 mL, (B) Concentração 2g em 200mL, (C) Concentração 3g em 200mL. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p<0,05$) (média±dp).....	43
Figura 4: Composição das infusões com 1g de folhas de oliveira cv. Santulhana em fenóis totais (mg GAE extrato ⁻¹), flavonóis (mg QE g extrato ⁻¹) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg CAE g extrato ⁻¹).Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($p<0,05$) (média±dp).....	46
Figura 5: Composição das infusões com 2g de folhas de oliveira cv. Santulhana em fenóis totais (mg GAE extrato ⁻¹), flavonóis (mg QE g extrato ⁻¹) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg CAE g extrato ⁻¹). Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($p<0,05$) (média±dp).....	47
Figura 6: Composição das infusões com 3g de folhas de oliveira cv. Santulhana em fenóis totais (mg GAE extrato ⁻¹), flavonóis (mg QE g extrato ⁻¹) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg CAE g extrato ⁻¹). Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($p<0,05$) (média±dp).....	48
Figura 7: Resultados obtidos para os parâmetros avaliados nas diferentes infusões de folha de oliveira cv. Santulhana pelo painel sensorial treinado. (A) Infusão a 60°C; (B) Infusão a 70°C; (C) Infusão a 80°C; (D) Infusão a 90°C; (E) Infusão a 100°C. P1: 1g de folha; P2: 2g de folhas; P3: 3g de folhas.	50
Figura 8: Resultados obtidos para os parâmetros avaliados com a roda de aroma nas diferentes infusões avaliadas pelo painel sensorial treinado. (A) Infusão a 60°C; (B) Infusão a 70°C; (C) Infusão a 80°C; (D) Infusão a 90°C; (E) Infusão a 100°C. P1: 1g de folha; P2: 2g de folhas; P3: 3g de folhas.	52

Figura 9: Estruturas químicas dos compostos voláteis identificados nas infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana.54

Índice de Tabelas

Tabela 1: Estruturas dos Flavonóides presentes na folha de oliveira	11
Tabela 2: Estruturas dos ácidos fenólicos presentes na folha de oliveira	13
Tabela 3: Álcoois fenólicos presentes na folha de oliveira.....	15
Tabela 4: Secoiridóides presentes nas folhas de oliveira.....	16
Tabela 5: Alimentos que consumidores portugueses consideram funcionais.....	18
Tabela 6: Rendimento de extração das infusões	31
Tabela 7: Composição fenólica das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana expressa em miligrama por grama de extrato.	33
Tabela 8: Composição fenólica das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana expressa em percentagem mássica.....	36
Tabela 9: Valores médios da capacidade redutora total.....	39
Tabela 10: Valores médios do efeito bloqueador dos radicais de DPPH	41
Tabela 11: Valores médios do poder redutor das infusões de folha de oliveira	45
Tabela 12: Valores médios das percentagens relativas dos principais compostos voláteis detetados em infusões de folhas de oliveira cv. Santulhana.	56
Tabela 13: Valores médios de taninos hidrolisáveis das infusões de folha de oliveira	59

Lista de abreviaturas e siglas

ABTS•+- Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolína-6-sulfónico

cv. - Cultivar

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

g- gramas

GAE- Equivalente de ácido gálico

mg- miligramas

mL- Mililitros

nm- Nanômetro

QE- Equivalente de quercetina

TAE- Equivalente de ácido tânico

λ- Comprimento de onda



Capítulo 1



Introdução

1. Introdução

Em Portugal, a oliveira encontra-se perfeitamente adaptada às condições edafoclimáticas, podendo ser encontrada em todo o País. Contudo, a sua maior expressão é nas zonas do interior, onde ocupa 9,2% da área agrícola utilizável (Matos *et al.*, 2014).

A região de Trás-os-Montes, uma das principais regiões nacionais produtoras de azeite, é diversificada em termos agroclimáticos, sendo na Terra Quente e de Transição, uma das culturas dominantes. Nesta região e de acordo com as características da zona, ao longo dos tempos, foi ocorrendo alguma especialização em termos de cultivares dominantes. Assim, no concelho de Bragança, Vimioso e parte de Macedo de Cavaleiros, a cultivar Santulhana representa 8% das oliveiras da região, sendo dominante em Izeda, Crl, onde representa mais de 90% das oliveiras (Monteiro, 1999). Esta cultivar é de grande porte, prefere solos profundos e férteis, e é de dupla aptidão, podendo ser usada tanto para extração de azeite como para produção de azeitona de mesa (Matos, 2015). Os seus frutos são classificados como grandes e seu peso como médio alto sendo seus frutos simétricos (Matos, 2015).

Nas últimas décadas, tem havido uma preocupação crescente com a ingestão de produtos de origem natural que para além do valor nutricional possam exercer algumas funções benéficas e com implicações positivas na saúde. Assim, os produtos originários de plantas com elevados teores de compostos fenólicos, têm tido uma atenção particular.

Dentre os compostos com capacidade antioxidante presentes nas plantas, os polifenóis são os mais abundantes e importantes. São compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, na qual exercem funções diversas. Quando incluídos na alimentação, pela ingestão de produtos de origem vegetal, têm importantes funções benéficas no organismo humano destacando-se as atividades anticancerígena, antioxidantes, antimicrobiana entre outras, atuando positivamente na redução dos riscos de diferentes cancros, obesidade, doenças cardiovasculares e outras doenças crónicas (Seraglio *et al.*, 2018). Os polifenóis estão presentes em abundância em frutas, hortaliças, e seus derivados, chocolates, vinho, café, e nas folhas de chá, por exemplo, onde pode chegar a representar até 30% do seu peso seco (Bock *et al.*, 2012).

Reconhecendo as importantes propriedades dos compostos fenólicos, e a importância do seu consumo, tem havido um grande volume de estudos, maioritariamente em plantas, no sentido da identificação de fontes/matrizes importantes nesses compostos, na sua identificação e na possibilidade da incorporação dessas matrizes na alimentação humana. Os subprodutos da atividade agrícola são exemplos de fontes naturais de substâncias antioxidantes, que podem ser reutilizados tornando-se rentáveis para extrair compostos de interesse, principalmente para a indústria alimentar (Afonso, 2014).

As folhas de oliveira são um subproduto abundante proveniente de uma indústria de elaboração de azeitona e extração de azeite, sendo umas das mais relevantes do setor agrícola e agroindustrial em Portugal. Durante o período de poda das oliveiras, e na limpeza de frutos após colheita, elas podem ser obtidas em grande quantidade. Esta matéria prima, para além de ser numerosa, é de baixo custo, tendo potencial para exploração como fonte de produtos com valor de mercado (Bissaro, 2015).

A utilização da folha de oliveira na medicina tradicional é conhecida desde a antiguidade no combate a febres e outras doenças, podendo ser utilizadas sob diversas formas e com diferentes finalidades. Uma das aplicações mais frequentes tem sido o tratamento de tensão arterial, que quando elevada se recomenda a ingestão de infusões de folhas de oliveira desidratadas, que também têm sido usadas para aumentar o volume e grau do fluxo urinário, tendo poder diurético (Sabry, 2014). Alguns estudos apontam que a ingestão de infusões permite uma absorção maior dos compostos bioativos presentes nas folhas de oliveira (Özcan & Matthäus, 2017).

Os principais compostos fenólicos identificados nas folhas de oliveira são da classe dos fenólicos simples, flavonóides e secoiridóides (Talhaoui *et al.*, 2015), que são provenientes do metabolismo secundário e tem funções protetoras da oliveira, podendo variar de acordo com a cultivar, as condições culturais, a época de colheita e o método de extração utilizado (Afonso, 2014). De todas as formas e apesar das variações apontadas, os compostos maioritários são a oleuropeína, a luteolina 7-*O*-glicosídeo, o hidroxitirosol e a apigenina 7-*O*-glicosídeo (Cagliari, 2017; Coppa *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2007).

As folhas de oliveira e os seus extratos são reconhecidos pela sua elevada capacidade antioxidante. Esse fato potenciou o interesse na sua utilização como aditivo natural na indústria alimentar, tendo sido já demonstrada sua eficácia na prevenção da oxidação de óleos e gorduras (Afonso, 2014; Coppa *et al.*, 2017; Malheiro *et al.*, 2017; Malheiro *et al.*, 2013), conferindo proteção e aumento da resistência à oxidação nos produtos testados. Por outro lado, como referido anteriormente, a sua utilização em infusões demonstrou trazer efeitos positivos para a saúde, que devido à sua eficácia o seu uso tem sido incentivado (Bock *et al.*, 2013; Kontogianni & Gerothanassis, 2012; Özcan *et al.*, 2017).

Em Portugal, um estudo realizado por Felício (2006), para a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), com o objetivo de avaliar o hábito de consumo de suplementos alimentares, verificou, considerando 81% dos entrevistados que utilizam ou já utilizaram suplementos alimentares, que cerca de 38% desses referem a utilização de suplementos constituídos por vegetais, tais como chás e suas infusões. Por outro lado, quanto ao analisarem o consumo de diversos produtos naturais, as infusões de plantas representam oito dos dez produtos naturais mais consumidos (Soares *et al.*, 2014). Com a ascensão da popularidade da folha de oliveira, como um agente antioxidante

natural, estudos relacionados com a sua utilização como aditivo alimentar e alimento funcional também aumentaram com o intuito de comprovar sua eficácia.

Neste sentido, com o presente trabalho objetivou-se contribuir para a caracterização e valorização das folhas de oliveira cv. Santulhana. Para tal, estudou-se a preparação de infusões com diferentes quantidades de folha e temperaturas de infusão, para determinar a melhor combinação em termos de preservação de compostos bioativos. Para atingir esse objectivo, foi avaliada a composição das infusões preparadas e a preferência em termos sensoriais, recorrendo à análise sensorial com recurso a um painel de provadores treinados, de modo a seleccionar a possível combinação mais apreciada por parte dos consumidores.

O trabalho encontra-se estruturado em quatro partes distintas, isto é, na próxima secção faz-se uma breve abordagem à folha de oliveira, nomeadamente à sua composição e atividade biológica, referindo-se também os trabalhos existentes acerca de infusões de folha de oliveira (Capítulo 2). O terceiro capítulo é destinado ao material e métodos, sendo que no quarto capítulo são apresentados os resultados do presente trabalho, procedendo-se à sua discussão. Apresentam-se também, as conclusões (Capítulo 5) e apontam-se sugestões para a possível continuação do trabalho no futuro.



Capítulo 2

Revisão bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

2.1. A oliveira (*Olea europaea* L.)

A oliveira, *Olea europaea* L.(figura 1), pertence à família *Oleaceae*, que contém 24 géneros e 900 espécies (Şahin & Bilgin, 2018). É uma árvore perene, das cultivadas há mais tempo, sendo uma das culturas mais importantes dos países mediterrâneos, onde representa grande relevância económica, ambiental e social (Pereira *et al.*, 2007), com grande longevidade, e com um período juvenil que pode variar de 10 a 15 anos. Na região mediterrânica, onde se pensa que pode ser o local de sua possível origem, e onde encontra condições climáticas apropriadas para o seu desenvolvimento, cresce nativamente em ambientes secos e rústicos (Coutinho *et al.*, 2009). Nesta localização podem existir oliveiras silvestres, selvagens e cultivadas, ocupando diferentes habitats (Rapoport *et al.*, 2016). A importância desta planta advém da produção de azeitona que é maioritariamente usada para extração de azeite e em menor escala para a produção de azeitona de mesa.

Ao longo dos anos de exploração, foi ocorrendo a domesticação das oliveiras, um processo contínuo e altamente complexo no qual as cultivares foram selecionadas em diversos tempos e localizações o que levou ao aparecimento de diversas estruturas das árvores e também de diferentes morfologias dos seus frutos (Rapoport *et al.*, 2016).

As suas folhas são persistentes, simples e com duração entre um e três anos e que podem apresentar diferentes formas como oval, linear, oblonga e com dimensões variadas. O tamanho da folha e a sua estrutura variam de acordo com o genótipo da árvore e também depende do desenvolvimento, além de variar conforme as condições de crescimento (Connor & Fereres, 2005). Nas árvores jovens tendem a ser menores e apresentam uma menor relação entre comprimento e largura, tal como acontece nas folhas das árvores silvestres (Rapoport *et al.*, 2016).



Figura 1: Oliveiras da cv. Santulhana.

Os frutos da oliveira, as azeitonas, são conhecidos e apreciados pelo mundo inteiro e são valorizados comercialmente, pois são utilizados para a extração de azeite e produção de azeitona de mesa. Ao longo do desenvolvimento do fruto ocorrem modificações na sua composição, que podem influenciar na qualidade dos seus produtos. As cultivares que são usadas para azeite, o teor de óleo extraído pode variar, havendo algumas, nas que apresentam maior rendimento, que atinge em média os 22% (Pacetta, 2013). O azeite possui diversas aplicações, sendo utilizado principalmente como um componente da alimentação e é conhecido pelos benefícios que aporta ao organismo humano, devido aos constituintes do seu óleo (Arantes, 2008; Pacetta, 2013).

As folhas de oliveira são um dos subprodutos da exploração agrícola, da extração do azeite, da exploração da azeitona de mesa e também da poda das árvores, e podem representar até cerca de 10% do peso total das azeitonas na chegada à unidade industrial (Bissaro, 2015). A poda da oliveira é uma prática essencial para o manejo do pomar, para melhorar a produtividade e garantir a frutificação. É um método que permite criar condições propícias para a árvore sintetizar os produtos necessários para o seu desenvolvimento, e isso depende da exposição à luz, disponibilidade de água e nutrientes, temperatura e da área foliar (Tombesi *et al.*, 2007).

Segundo Conde *et al.* (2009), estima-se que são produzidos a cada ano em média três toneladas de biomassa proveniente da poda da oliveira por hectare, o que torna esses subprodutos uma fonte ampla, barata e pouco explorada de energia ou produtos químicos.

Dessa forma, dada a importância da oliveira e o volume gerado deste subproduto barato, a sua valorização e criação de produtos de alto valor agregado pode representar uma mais-valia importante num contexto de circularidade na agricultura (Rahmanian *et al.*, 2015).

2.2. Folhas de oliveira

Durante muitos anos, as folhas de oliveira e as infusões com elas preparadas, foram consideradas como tendo uma ação positiva na preservação e prevenção da saúde, o que está muito associado à sua composição rica em compostos fenólicos (Şahin *et al.*, 2018). Estes compostos têm despertado interesse dos investigadores de todo o mundo, sendo-lhe reconhecida capacidade antioxidante, anti-hipertensiva, hipoglicemia, hipocolesterolêmica, cardioprotetora, anti-inflamatória e coadjuvante no tratamento da obesidade (Vogel *et al.*, 2015).

Nas folhas da oliveira podem ser encontradas mais de 40 estruturas de fenóis, possuindo elevada atividade antioxidante, que é devido ao seu alto potencial redox o que lhes permite atuar de diferentes formas (Kajdzanoska *et al.*, 2011; Pacetta, 2013). A composição das folhas varia de acordo com a cultivar, a idade da planta, condições climáticas, estado sanitário, proporção de madeira, práticas agrícolas, ciclo biológico da oliveira e também das condições de extração para a sua avaliação (Ghomari *et al.*, 2019; Rahmanian *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos da oliveira são resultantes do metabolismo secundário das plantas e são consequência da reação da planta a agentes externos como ataques de patógenos ou insetos, condições culturais e ambientais adversas e outros fatores como, por exemplo, as radiações (Nehir El & Karakaya, 2009).

Diversos grupos de compostos fenólicos têm sido alvo de estudos nas últimas décadas, principalmente os secoiridóides e iridóides devido às suas atividades farmacológicas (Hashmi *et al.*, 2015). Além disso, esses compostos têm sido de grande interesse para a indústria alimentar, uma vez que, devido às suas propriedades antioxidantes, podem aumentar o tempo de prateleira dos produtos atuando através da desaceleração do processo de oxidação dos lípidos. Assim, os extratos das folhas têm sido estudados como um aditivo para aumentar a estabilidade de alguns géneros alimentícios como óleos vegetais e carnes (Medina *et al.*, 2019) atuando ainda como agentes antimicrobianos contra algumas bactérias (Sudjana *et al.*, 2009), fungos (Korukluoglu *et al.*, 2008) e vírus (Micol *et al.*, 2005).

2.2.1. Propriedades biológicas da folha de oliveira

As plantas, desde a antiguidade, são utilizadas pelo ser humano na alimentação, na cura de doenças e na agricultura. Elas possuem a capacidade de produzir componentes orgânicos que são divididos entre metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, enquanto os secundários, que geralmente apresentam estrutura complexa, são divididos em três grupos quimicamente distintos: os terpenos, os compostos fenólicos e componentes contendo azoto, estando presentes em baixas concentrações e em apenas determinados tipos de plantas (Pereira & Cardoso, 2012; Vizzotto *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos são compostos multifuncionais, e têm sido os mais estudados pela sua elevada capacidade antioxidante, são conhecidos mais de 5000 compostos (Angelo & Jorge, 2007). Quimicamente, apresentam um anel aromático com um ou mais substituintes, com ligações a um ou mais grupos hidroxilo, incluindo os seus derivados funcionais e agrupam-se em diferentes classes, destacando-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os fenóis simples, os taninos, as ligninas e os tocoferóis (Angelo *et al.*, 2007).

A sua ação ocorre através da interação com o mecanismo de defesa contra danos oxidativos ocasionados por espécies reativas de oxigénio (ROS). Assim, a capacidade antioxidante desses compostos está relacionada com diferentes mecanismos como a neutralização e captura de radicais livres, doação de hidrogénio, e também por agirem como substrato para alguns radicais livres, atuando tanto na fase de iniciação quanto no processo de propagação da oxidação (Bueno, 2019).

Em relação à oliveira, estes compostos estão presentes em todas as partes da planta, mas os que estão definitivamente presentes nas folhas fazem parte de uma estrutura muito complexa, isso

porque a maioria dos compostos são armazenados na forma conjugada, com mono ou polissacarídeos (Afonso, 2014).

Entre as substâncias bioativas presentes nas folhas, o composto fenólico mais ativo é o componente responsável pelo amargor, a oleuropeína que pode estar presente entre 6 e 9% na folha desidratada (Medina *et al.*, 2019; Romani *et al.*, 2017). Outros compostos fenólicos presentes nas folhas incluem os derivados da oleuropeína, como o hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, verbascosídeo, luteolina 7-*O*-glucósido, apigenina 7-*O*-glucósido, catequinas entre outros (Afonso, 2014; Nehir El & Karakaya, 2009; Medina *et al.*, 2019).

A oleuropeína é um antioxidante potente com ação anti-inflamatória. A sua ação de prevenir a formação de radicais livres ocorre devido à sua capacidade de quelar íons metálicos como, por exemplo, o ferro e o cobre que são compostos que catalisam reações de formação de radicais livres. Por outro lado, a oleuropeína é também capaz de inibir diversas enzimas inflamatórias, como a lipoxigenase, sem afetar a via cicloxigenase (Andrikopoulos *et al.*, 2002; Benavente-Garcia *et al.*, 2000; Visioli *et al.*, 2002). O hidroxitirosol, um produto derivado da oleuropeína, partilha também de algumas das suas propriedades biológicas, como a capacidade antioxidante, antimicrobiana, hipoglicémica entre outras (Bouaziz & Sayadi, 2005; Özcan *et al.*, 2017).

Todos esses compostos que estão presentes em sua composição atuam no organismo humano, ligando-se aos radicais livres em excesso que o corpo produz evitando o stress oxidativo, impedindo-os de atacar as nossas células e de originarem doenças. Uma das ações benéficas mais apontadas aos antioxidantes é o facto de contribuírem para a prevenção de doenças do coração impedindo a oxidação de lípidos da membrana (Nehir El & Karakaya, 2009). Alguns estudos mostraram que os polifenóis presentes nas folhas de oliveira têm efeitos benéficos no colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (Susalit *et al.*, 2011) contribuindo para a redução de doenças cardiovasculares. Em contrapartida, o uso dos extratos contendo oleuropeína e hidroxitirosol foi capaz de restaurar o perfil lipídico de pacientes, provando que esses compostos podem melhorar significativamente a hipercolesterolemia associada à hiperglicemia (Jemai *et al.*, 2009).

Outros trabalhos comprovaram que, em homens de meia idade com sobrepeso e com risco de diabetes, a suplementação com os polifenóis da folha de oliveira durante um período de doze semanas melhorou significativamente dois aspectos da regulação da glicose, a sensibilidade à insulina e a capacidade de secretar das células pancreáticas (Bock *et al.*, 2013; Romani *et al.*, 2019). A utilização de extratos pode também ser benéfica para aplicação na pele, uma vez que a presença dos flavonóides e do ácido oleanólico estimula os compostos do tecido conjuntivo e o regulariza, aumentando a saúde da pele e a sua proteção contra o envelhecimento (Castillo *et al.*, 2010).

As folhas, devido ao seu alto potencial biológico, são já comercializadas para a preparação de infusões e como suplemento alimentar. São normalmente consumidas oralmente para tratar de

doenças estomacais e intestinais, e mastigadas com um intuito de limpar a boca. Outra técnica utilizada para o consumo das folhas e os frutos da oliveira desidratados é a partir da decocção para curar disenterias e infecções do trato urinário, além de proporcionar benefícios ao metabolismo quando utilizadas como um medicamento tradicional (Briante *et al.*, 2002; Hollman *et al.*, 1995; Özcan *et al.*, 2017; Zarzuelo *et al.*, 1991).

Contudo, as funções mais conhecidas das folhas de oliveira são a sua utilização para tratar a hipertensão e agir como um diurético natural (Özcan *et al.*, 2017). A ação das folhas de oliveira mostrou ser mais eficiente e potente quando comparada ao chá verde, trazendo benefícios para a saúde pela sua ação anticancerígena e antimicrobiana para além do seu efeito modulador de radicais livres (Dominciano, 2015; Mello & Pinheiro, 2012)

Para além dos efeitos conhecidos das folhas da oliveira em fitoterapia, muitos deles desde a antiguidade a sua utilização tem recebido interesse da indústria alimentar, pela sua possível utilização como antioxidante natural, existente em grande quantidade, a baixo preço e sem os efeitos nefastos dos antioxidantes sintéticos, com benefícios para a população.

2.2.2. Composição fenólica das folhas de oliveira

As folhas de oliveira, como já referido anteriormente, são um subproduto da agricultura do olival, são amplamente estudadas devido à sua composição rica em compostos fenólicos (Goulas *et al.*, 2009). São compostos considerados valiosos e presentes nas folhas em quantidade considerável e com natureza diversa, sendo agrupados de acordo com as suas características moleculares, por exemplo, ácidos simples e fenóis (Tsimidou & Papoti, 2010).

Essa composição, rica em compostos fenólicos, pode variar qualitativamente e quantitativamente devido a fatores como as condições de secagem e extração, colheita, cultivar entre outros (Abaza *et al.*, 2015).

2.2.2.1. Flavonóides

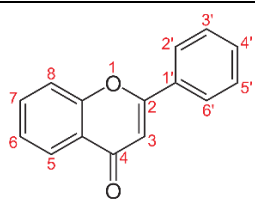
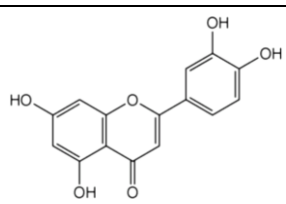
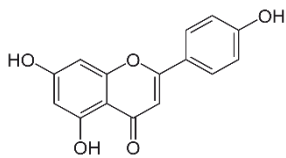
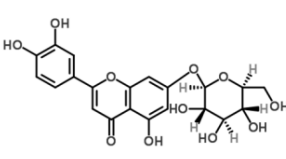
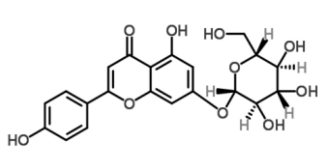
Os flavonóides (Tabela 1) são substâncias fenólicas isolados de uma ampla variedade de plantas vasculares, e são formados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e malonato. As diferentes classes de flavonóides diferenciam-se de acordo com o nível de oxidação e pelo padrão de substituição no anel composto por 3 carbonos, enquanto os compostos individuais diferenciam-se dentro de uma classe de acordo com o padrão de substituição dos outros dois anéis, sua estrutura base são as flavonas que consistem em um grupo de 15 átomos de carbonos distribuídos em três anéis ($C_6 - C_3 - C_6$) (Pietta, 2000).

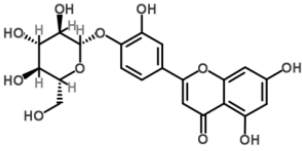
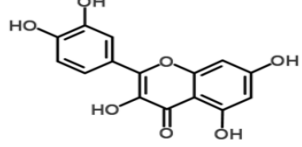
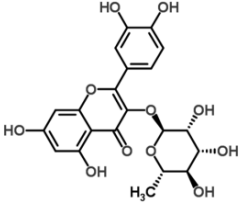
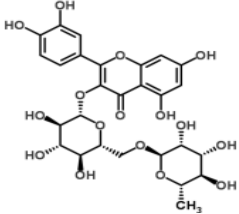
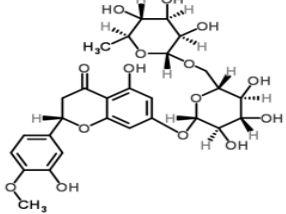
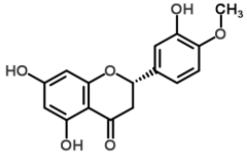
São o grupo mais comum de compostos polifenólicos que fazem parte da dieta humana, com mais de 1600 tipos (Charoenprasert & Mitchell, 2012). São compostos que aparecem naturalmente

em frutas, hortaliças, nozes, sementes, flores e casca e estão associados a um amplo espectro de efeitos benéficos à saúde e são componentes indispensáveis em uma variedade de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e aplicações cosméticas (Panche *et al.*, 2016). Essa gama de utilidade ocorre em virtude das diversas propriedades biológicas incluindo ação anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana e vasodilatadora (Cook & Samman, 1996).

São substâncias divididas em subgrupos, flavonas, flavonóis, chalconas, flavanonas, flavanas, antocianinas, isoflavonas e neoflavonóides. Cada um desses grupos possuem características específicas e se diferenciam entre si de acordo com a substituição nos anéis da estrutura básica dos flavonóides (Bravo, 1998; Dornas *et al.*, 2009; Panche *et al.*, 2016). As folhas de oliveira apresentam uma quantidade significativa de flavonóides tendo em destaque as flavonas luteolina e seus derivados, flavonóis e flavanonas.

Tabela 1: Estruturas dos Flavonóides presentes na folha de oliveira

Grupos dos flavonóides	Subgrupos	Estrutura Química
Flavonóides (base)		
Flavonas	Luteolina	
	Apigenina	
	Luteolina 7-O-glucósido	
	Apigenina 7-O-glucósido	

	Luteolina 4'- <i>O</i> -glucósido	
	Quercetina	
Flavonóis	Quercitrina	
	Rutina	
Flavanonas	Hesperidina	
	Hesperitina	

Fonte: Adaptado de (Afonso, 2014; Bhagwat *et al.*, 2011)

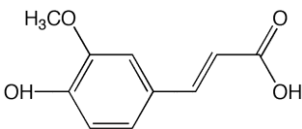
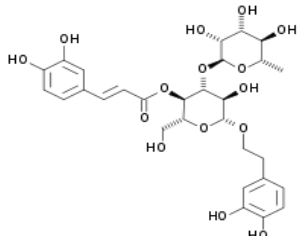
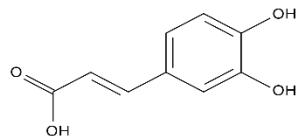
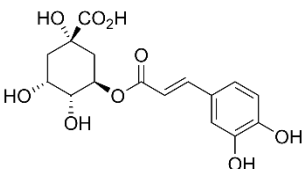
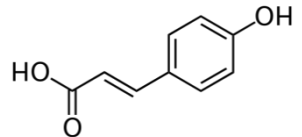
2.2.2.2. Ácidos fenólicos

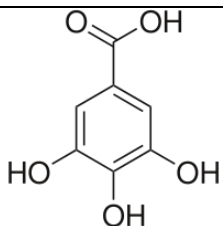
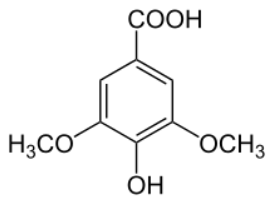
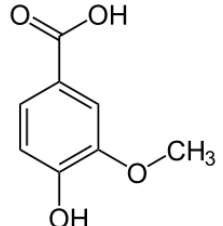
Os ácidos fenólicos (Tabela 2) apresentam quimicamente um grupo funcional carboxilo e são divididos em duas classes, os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Estes compostos antioxidantes podem estar presentes nos alimentos na forma livre ou complexada, são substâncias que já foram quantificadas em diversos tipos e variedades de frutas e hortaliças, tendo correlação com a atividade antioxidante de cada uma delas.

O grupo dos ácidos hidroxibenzoicos são constituintes da estrutura dos taninos hidrolisáveis, e estão presentes em pequenas quantidades nos vegetais consumidos pelos humanos (Oliveira & Bastos, 2011; Rockenbach *et al.*, 2009).

Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em diversos produtos alimentares, como o café, ameixa, erva mate, maçã e também podem ser encontrados na sua forma livre em alimentos como o tomate e a cerveja, exemplos de compostos dessa classe são os ácidos cafeico, ferúlico e sinápico (Oliveira *et al.*, 2011). Nas folhas de oliveira, o grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, estão presentes em quantidades significativas e principalmente sob a forma de combinações tipo éster ou glicosídeos, como os ésteres dos ácidos cafeico e seus derivados, cumárico e ferúlico, e também o ácido clorogénico e ácido gálico (Afonso, 2014; Cagliari, 2017).

Tabela 2: Estruturas dos ácidos fenólicos presentes na folha de oliveira

Classes	Compostos fenólicos	Estrutura química
Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido ferúlico	
	Verbascosídeo	
	Ácido cafeico	
	Ácido clorogénico	
	Ácido <i>p</i> -cumárico	

Ácidos hidroxibenzoícos	Ácido gálico	
	Ácido siríngico	
	Ácido vanílico	

Fonte: Adaptado de Afonso (2014)

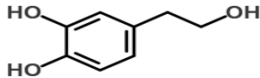
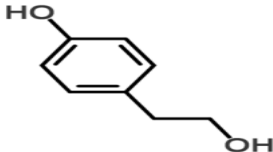
2.2.2.3. Álcoois fenólicos

Os álcoois fenólicos (Tabela 3) são substâncias que estão presentes na folha de oliveira em quantidade significativa, sob a forma de hidroxitirosol (3,4-dihidroxifenilmetanol) e tirosol (*p* – hidroxifeniletanol), podendo também ser processados como derivados da oleuropeína (Micol *et al.*, 2005). Estes compostos contribuem para o amargor, adstringência das folhas de oliveira e conferem-lhe resistência à oxidação (Singh *et al.*, 2008). O hidroxitirosol é um composto de reconhecida bioatividade, sobretudo do pontos de vista antioxidante e antimicrobiano (Leonardis *et al.*, 2008), cardioprotetor, anticancerígeno, neuroprotetor e com efeitos endócrinos benéficos (Marković *et al.*, 2019).

A sua capacidade antioxidante está relacionada com sua afinidade estrutural com alguns compostos, função protetora nas células e por ter uma estrutura simples que também está presente no organismo humano. Além disso, a capacidade antioxidante dá-se devido à presença da porção *o*-di-hidroxifenil, que atua quebrando ligações da cadeia através da doação de átomos de hidrogénio para o radical peróxido (ROO*) (Marković *et al.*, 2019; Martínez *et al.*, 2018).

O tirosol é um composto fenólico muito estável quando comparado com outros compostos da mesma categoria. Mesmo em condições críticas é capaz de manter a atividade antioxidante, resistindo também à auto-oxidação. Apresenta efeito neuroprotetor, inibe o desenvolvimento de diferentes estirpes de bactérias responsáveis por infeções intestinais e respiratórias. Este composto possui baixa biodisponibilidade, sendo rapidamente absorvido e excretado pelo organismo, em apenas oito horas após o seu consumo (Marković *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2006).

Tabela 3: Álcoois fenólicos presentes na folha de oliveira

	Compostos fenólicos	Estrutura química
Álcoois fenólicos	Hidroxitirosol	
	Tirosol	

Fonte: Adaptado de Martínez *et al.* (2018)

2.2.2.4. Secoiridóides

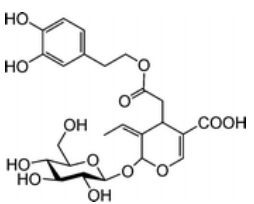
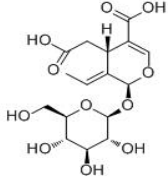
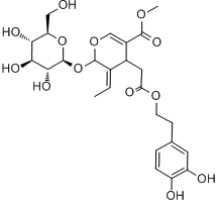
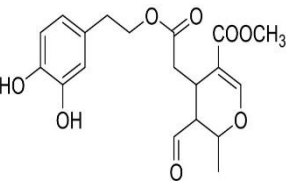
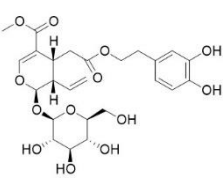
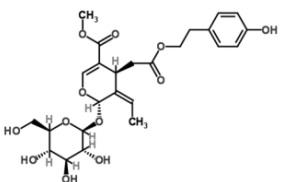
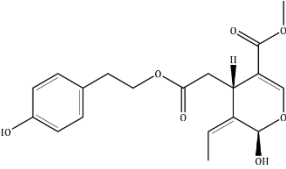
Os secoiridóides (Tabela 4) são um grupo de compostos encontrados nas espécies de *Oleaceae* incluindo a oliveira (*O. europaea*), são originários dos metabolitos secundários das plantas. Os secoiridóides derivam dos glicosídeos oleosídeos compostos caracterizados pela presença do ácido elenólico (ou seu derivado) na sua estrutura, representam a maioria dos compostos polifenólicos presentes nas folhas de oliveira e no azeite (Afonso, 2014; Celano *et al.*, 2019). Um dos mais importantes é a oleuropeína, composto mais abundantes nas folhas de oliveira com concentrações de 60-90 mg/g de matéria seca nas folhas de árvores jovens (Gamli, 2016).

Quimicamente, a oleuropeína, que é um fenol complexo possui uma estrutura grande. Esta é a responsável pelo amargor das azeitonas, e pode ser identificada como éster heterosídico do ácido elenólico e dihidroxietanol (Coppa, 2016; Efmorfopoulou & Rodis, 2004). A molécula da oleuropeína pode ser hidrolisada com outros compostos como o ácido elenólico glucósido, aglicona da oleuropeína, glicose e o seu principal derivado o hidroxitirosol (Pacetta, 2013), fazendo parte dos fenóis da folha da oliveira. Alguns trabalhos demonstraram que a oleuropeína pode ser efetiva contra certos microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e alguns tipos de parasitas (Benavente-García *et al.*, 2000; Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018).

Além dos benefícios mencionados, a oleuropeína foi estudada no combate às bactérias mais preocupantes na indústria alimentar, formadoras de biofilme e com grande resistência aos antimicrobianos utilizados, tendo-se verificado que a presença de oleuropeína potencializa o efeito bactericida dos compostos comerciais utilizados, mais especificamente o ácido peracético

principalmente para eliminação de biofilmes formados por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfícies inertes (Dominciano, 2015).

Tabela 4: Secoiridóides presentes nas folhas de oliveira

		Compostos fenólicos	Estrutura química
Secoiridóides	Demetiloleuropeína		
	Oleósido		
	Oleuropeína		
	Aglicona da oleuropeína		
	Oleurósido		
	Ligstrósido		
	Ligstrósido aglicona		

Fonte: Adaptado de Tsimidou *et al.* (2010)

2.3. Inovação no setor de infusões

A inovação de produtos é um item fundamental para a sobrevivência da maioria das empresas, tendo sempre que relacionar a inovação com as tendências, necessidades ou moda de consumo (Barboza *et al.*, 2003). A indústria de alimentos está sempre inclinada a desenvolver diversos produtos que satisfaçam os consumidores, que atualmente têm expectativas altas em relação aos novos produtos, em questão de qualidade e atendimento às suas necessidades, tornando a fidelidade as marcas diminuída e o mercado alimentício mais competitivo (Wille *et al.*, 2004).

O processo de desenvolver um novo produto na área alimentar é complexo, pois exige a participação de diversos setores dentro da empresa, ou seja, é um projeto multidisciplinar que envolve a equipe de pesquisa e desenvolvimento, marketing, produção, entre outros (Wille *et al.*, 2004). A tendência atual no setor alimentar é a alimentação saudável, com o intuito de melhorar a qualidade de vida substituindo os produtos com ingredientes que quando consumidos em excesso prejudicam a saúde, por aqueles naturais ao organismo ou até mesmo que traga benefícios ao nível do organismo humano (Gouveia, 2006).

A mudança na alimentação dos consumidores é devido às consequências observadas durante anos de uma alimentação desregulada o que acarretou no aparecimento de epidemias de doenças crônicas, como por exemplo, a obesidade que apresenta prevalência de comorbidade tendo associada a mesma doença, a hipertensão (Prieto-Hontoria, 2016). O processamento industrial dos alimentos acarretou num impacto na qualidade nutricional, trazendo para a dieta da população novos ingredientes e métodos que vão aparecendo nos mercados todos os dias (Monteiro *et al.*, 2016).

E, como consequência, atualmente a demanda por alimentos e bebidas que proporcionem benefícios à saúde, sendo eles denominados alimentos funcionais que além de oferecer as funções nutricionais básicas, afetam positivamente as funções fisiológicas do organismo, favorecendo a saúde, reduzindo o risco de doenças e melhorando a qualidade de vida (Couto *et al.*, 2015). Esses alimentos podem ser classificados de acordo com a sua fonte, de origem animal ou vegetal, e conforme os benefícios que oferecem e atuam em diferentes áreas do organismo como no comportamento das funções fisiológicas e antioxidante (Moraes, 2007).

Além dos alimentos funcionais, têm-se os nutracêuticos, que proporcionam benefícios medicamentosos e de saúde, tendo inclusivamente a prevenção e tratamento de doenças. Essa classe de alimentos incluem fibras dietéticas, ácidos gordos polinsaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos, minerais, vitaminas e antioxidantes (Moraes, 2007). Para esse tipo de alimento a prevenção e o tratamento de doenças tem grande significância, enquanto os funcionais o intuito é apenas reduzir o risco da doença, além disso os nutracêuticos podem incluir suplementos alimentares e outros tipos de alimentos, já os funcionais devem obrigatoriamente se apresentar na forma de alimento comum (Kwak & Jukes, 2001; Moraes, 2007).

Na visão do consumidor, os produtos funcionais e nutracêuticos devem ser de qualidade, seguros e que tragam saudabilidade juntamente com sabor, relação preço/qualidade e a sua funcionalidade. O mercado para esse tipo de alimento tem a sua própria característica por ser jovem e com alto potencial de crescimento, porém é uma área que por ser relativamente nova apresenta a necessidade de regulamentação, controle e comunicação que seja baseado em pesquisas de alto nível para criar confiança do consumidor e também dos produtores em uma cadeia de alimentos mais saudável e segura (Salgado, 2016). Segundo estudos realizados por Ferrão (2012), os consumidores portugueses identificam alimentos funcionais (Tabela 5) como sendo em primeiro lugar frutas e hortaliças, em segundo os peixes e os frutos oleaginosos, em terceiro, além de identificarem outros alimentos como sendo benéficos à saúde.

Tabela 5: Alimentos que consumidores portugueses consideram funcionais

Tipo de alimento	Porcentagem (%)
Frutas e hortaliças	85
Peixes e produtos de pesca	66
Frutos oleaginosos	54
Cereais integrais	50
Laticínios	42
Chá	29
Carne e derivados	28
Gorduras vegetais	27
Ervas/especiarias	24

Fonte: Adaptado de Ferrão (2012)

Como observado, o chá está entre os alimentos considerados funcionais pelos consumidores, principalmente por ser uma bebida antiga e conhecida por seus benefícios à saúde com a capacidade de diminuir o risco de certas doenças devido aos compostos bioativos em sua composição, como os compostos fenólicos que estão presentes, por exemplo, nas infusões de folha de oliveira.

Esses compostos bioativos podem auxiliar na redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos, cancro e doenças neurodegenerativas, esses efeitos são obtidos através da ingestão regular na dieta de alimentos funcionais que contenham essas substâncias (Senger *et al.*, 2010).

Essas substâncias têm uma gama ampla de utilidades e benefícios, e podem ser empregadas em diversas áreas no setor industrial e, seguindo o contexto de alimentação natural, os antioxidantes podem ser artificiais e naturais, sendo os naturais encontrados em plantas na forma de compostos fenólicos, como anteriormente mencionado nas folhas de oliveiras, uma fonte de baixo custo por ser

um subproduto da colheita e da produção de azeite e ideal para a tendência de mercado dos dias atuais, uma vez que a indústria alimentar se sustenta ao fomentar o desejo dos consumidores (Bernardes *et al.*, 2010).

2.4. Folhas de oliveira no âmbito da indústria agroalimentar

Como anteriormente referido, as folhas de oliveira são um subproduto barato e existente em grande quantidade. Assim, podem ser valorizadas com o objetivo de aumentar a sustentabilidade desse setor agrícola, uma vez que as folhas são abundantes e ricas em substâncias que podem ser utilizadas na indústria agroalimentar (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013).

Existem estudos sobre a utilização do extrato obtido através da folha de oliveira e a sua utilização como agente antioxidante e enriquecedor na indústria alimentar. São vários trabalhos sobre a adição dos extratos em óleos vegetais, que normalmente são muito suscetíveis à oxidação. Ao adicionarem extrato hidroalcolico de folha de oliveira, rico em compostos fenólicos e em especial oleuropeína, aos óleos de canola e girassol, Jiménez *et al.* (2017) verificaram que a adição reduziu a formação de compostos polares, que indicam a degradação dos óleos. Também, Şahin *et al.* (2017) ao adicionarem 0,12% de extrato de folhas de oliveira ao óleo de milho observaram a diminuição de radicais livres e aumento da estabilidade oxidativa, contribuindo para prolongar o tempo de prateleira do produto. Por sua vez, Chiou *et al.* (2007) ao enriquecerem três tipos de óleos, de girassol, palma e azeite, para usar em fritura de batata, observaram um produto final com compostos fenólicos como a oleuropeína e um óleo mais rico em biofenóis, indicando que estes compostos suportam temperaturas elevadas de fritura.

A adição de extrato aquoso de folhas de oliveira em óleo de soja, e a avaliação da sua resistência ao aquecimento em micro-ondas, aumentou a resistência à oxidação do óleo e protegeu alguns dos seus componentes como a vitamina E (Malheiro *et al.*, 2013). Em produtos cárneos, como hambúrguer fresco, carne moída e carne de ovelha a aplicação do extrato de folha de oliveira aumentou significativamente o tempo de prateleira dos produtos, interferindo positivamente no atraso da oxidação das carnes e na inibição do desenvolvimento de microrganismos de deterioração, podendo considerar-se que o extrato apresenta propriedades funcionais (Al-Rimawi *et al.*, 2017; Baker, 2014; Shalaby *et al.*, 2018).

Alguns trabalhos reportam o uso de folhas de oliveira em natura principalmente durante a extração do azeite, contribuindo desta forma para a melhoria das características sensoriais e de resistência à oxidação (Malheiro *et al.*, 2017).

Além da atividade antioxidante, as folhas apresentam capacidade antimicrobiana, que pode ser uma vertente a ser explorada na indústria agroalimentar como sua aplicação em biofilmes e produção de filmes biodegradáveis para conservação de alimentos, uma vez que são eficazes contra *E.coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Dominciano, 2015; Martiny *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2017).

Os estudos à procura de aditivos de origem natural intensificaram-se devido à mudança dos hábitos alimentares dos consumidores e dos efeitos colaterais na saúde ocasionados pelo seu consumo, como a procura por compostos naturais que retardam a oxidação lipídica, que no caso é a folha de oliveira, para aumentar a qualidade do produto, prolongar a vida de prateleira e manter ou também aumentar o valor nutricional dos alimentos (Al-Rimawi *et al.*, 2017) e associando esse fator ao da sustentabilidade eles se tornam formas propícias para a valorização de resíduos no setor da olivicultura.

2.5. Infusões

A infusão é um processo utilizado para extrair compostos químicos de plantas a partir da sua imersão em água a temperaturas elevadas para acelerar o processo. Muitos dos consumidores confundem as infusões com chá. Contudo a terminologia “chá” é designada apenas às infusões preparadas com variedades de *Camellia sinensis*, que é uma das bebidas mais consumidas do mundo devido ao seu sabor, seus benefícios para a saúde e aspetos culturais e sociais (Zachara *et al.*, 2018).

As infusões são obtidas de plantas ou partes delas desidratadas, com grande popularidade na atualidade. Fazem parte de uma dieta equilibrada e diferem das outras bebidas por apresentarem baixos teores em açúcar e reduzidas calorias para além da elevada riqueza nutricional (Ribeiro, 2015). As partes das plantas que são utilizadas para a obtenção das infusões dependem da localização das suas substâncias aromáticas, que podem estar presentes nas folhas, nos frutos ou nas flores.

São utilizadas cerca de 300 plantas diferentes e mais de 400 partes delas como constituintes para a preparação das infusões, como por exemplo, as folhas, frutas ou flores. A infusão é uma bebida utilizada como uma opção saudável para o consumo no intuito de atingir o objetivo de ingerir no mínimo dois litros de líquidos com baixo teor calórico por dia (THIE, 2019; Zachara *et al.*, 2018). Especificamente, no nordeste de Portugal as espécies mais utilizadas em preparo de infusões são *Melissa officinalis* L. (Cidreira), *Foeniculum vulgare* Mill. (Funcho), *Matricaria recutita* (Camomila) e *Tilia platyphyllos* Scop. (Tília) (Ribeiro, 2015).

O seu consumo tem aumentado rapidamente, devido à comprovação das atividades biológicas benéficas que proporcionam para quem as ingere (Zhang *et al.*, 2020).

Muitos dos compostos fenólicos que estão presentes nas plantas, são antioxidantes mais eficazes que as vitaminas C e E, a capacidade de se ligar aos radicais livres é essencial para a prevenção de danos oxidativos nas células do corpo humano, que podem ser causados pela exposição a certos compostos químicos, o interesse nesses compostos provenientes de origem natural aumentou devido à associação do consumo de compostos comerciais sintéticos como o Hidroxianisol Butilado (BHA), Hidroxitolueno Butilado (BHT) e ésteres do ácido gálico a efeitos negativos à saúde (Shikanga *et al.*, 2010).

Devido ao crescente consumo de infusões, as empresas têm desenvolvido diferentes formas de apresentação do produto para facilitar o seu uso. A utilização de saquinhos de chá, mais convenientes no uso do que a planta a granel, tem tido aplicação generalizada, principalmente nos locais de trabalho, pela facilidade de preparação, fácil de descartar, economizam tempo e estão disponíveis com ampla variedade de sabores no mercado que ainda podem ser misturados inovando no sabor (Bassi *et al.*, 2020). No entanto saquetas de folhas de oliveira ainda não são usuais na maioria das marcas comerciais, pelo que há ainda um conjunto de estudos a serem realizados.

2.5.1. Fatores que influenciam na qualidade das infusões.

A preparação de infusões encontra-se muito relacionada com a cultura do País onde são preparadas. Alguns aspetos como o tempo de infusão, proporção de planta e água utilizadas, agitação, temperatura, qualidade da água, têm implicações na quantidade de compostos extraídos, influenciando nas características sensoriais e na bioatividade das infusões (Ribeiro, 2015).

No processo de preparo das infusões, o tempo de contato com a água é um dos fatores que contribui para que os compostos antioxidantes fiquem retidos, quando em excesso pode danificar as folhas e quando em quantidade insuficiente pode iniciar o processo de fermentação, e no momento em que esse processo ocorre as propriedades antioxidantes e as características organolépticas podem ser afetadas (Singh *et al.*, 2014).

A maneira usual de preparação das infusões é proceder à adição de água quente às folhas ou saquinhos, com o objetivo de extrair os compostos a serem ingeridos, sendo necessário haver algum tempo de contato com a água. Existem, fundamentalmente, cinco fatores que podem influenciar a quantidade de compostos extraídos e nas propriedades sensoriais das infusões, que são a qualidade da água, a concentração de plantas, a temperatura da água, a qualidade da matéria prima e o tempo de infusão. O aperfeiçoamento dessas condições possibilita que os consumidores apreciem as infusões com um nível sensorial elevado, sem a necessidade de adição de açúcares que acabam mascarando possíveis sabores desagradáveis, tornando o consumo das infusões um prazer e não apenas pela necessidade dos seus efeitos medicinais (Ferreira, 2016).

A qualidade da água utilizada nas infusões é um parâmetro essencial para a obtenção de um produto final com qualidade. O teor de minerais presentes na água, por exemplo, pode influenciar a capacidade de extração de polifenóis. O cálcio reduz a extração devido à sua fixação na parede celular, ou seja, quanto maior a quantidade de compostos minerais na água, menor é o rendimento de extração de compostos orgânicos das folhas (Mossion *et al.*, 2008). A utilização de água pura pode ser uma solução uma vez que nos trabalhos realizados por Zhang *et al.* (2017), o uso de água pura, em comparação com água de nascente e água de torneira, na preparação de chás alcançou um teor superior de compostos, o que estará relacionado com a baixa acidez e menor viscosidade. No entanto,

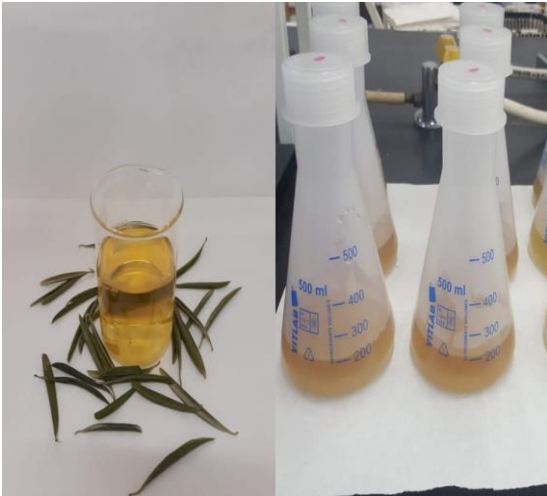
o mesmo estudo indica que na extração de compostos como a cafeína e a teanina a água de nascente foi mais eficiente, enquanto a água pura aumentou as notas sensoriais do chá relativamente à cor, aroma e sabor.

A qualidade da matéria prima é também um fator com influência determinante uma vez que pode ter uma relação direta com as características sensoriais e a quantidade de compostos extraídos. Por outro lado, a quantidade de matéria-prima utilizada para a preparação tem interferência na temperatura e no tempo de infusão para obter uma infusão sensorialmente agradável, afetando a quantidade de compostos extraídos e conseqüentemente a bioactividade das infusões (Cardoso, 2013).

A temperatura tem também uma influência determinante. Alguns estudos avaliaram a influência da temperatura sobre a extração de compostos bioativos de chás (Almeida *et al.*, 2019; Bassi *et al.*, 2020; Yildirim *et al.*, 2017). No geral, quanto mais alta a temperatura maior é a extração dos compostos. Os mesmos autores avaliaram o tempo de contato e o tamanho da matéria utilizada para a infusão, concluindo que quanto menores as partículas, maior a superfície de contato com a água e melhor a extração de substâncias das folhas.

Segundo Liu *et al.* (2018), no caso do chá verde, para ter uma alta atividade antioxidante as condições ótimas de preparação são de 90°C durante aproximadamente 9,50 minutos enquanto para melhores características sensoriais, as condições são de 82°C por 5,70 minutos. Uma vez que também as folhas de oliveira são muito ricas em compostos fenólicos, a preparação de infusões com essa matriz pode ter características semelhantes. Os estudos feitos por Yildirim *et al.* (2017) também indicaram que a temperatura elevada e maior tempo de contato aumentam a quantidade de compostos bioativos presentes nos chás, e que por esse motivo as condições da infusão devem ser ajustadas para melhorar a funcionalidade da bebida.

Almeida *et al.* (2019) realizaram um estudo sobre a influência do método de preparação nas concentrações de compostos fenólicos e na atividade antioxidante e antidiabética de chá verde e preto, e concluíram que a temperatura da água tem impacto na composição do chá obtido, recomendando a preparação nas temperaturas de 80 e 90°C para a obtenção de uma bebida com boas propriedades antioxidantes. Compararam também a utilização de saquinhos de chá com folhas na preparação das infusões, observando-se maior concentração de fenóis quando eram utilizados saquinhos, o que está relacionado com uma maior área de superfície das aberturas nas saquetas de chá permitindo uma melhor extração dos compostos antioxidantes.



Capítulo 3

Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Amostras

Para o presente trabalho foram utilizadas amostras de folhas de oliveira cv. Santulhana, uma cultivar de Trás-os-Montes. As folhas foram colhidas na localidade de Santulhão, Vimioso, em março de 2019. Após colheita foram transportadas para o laboratório, escolhidas e retirados os ramos, folhas malformadas e que apresentavam sintomas de ataque de praga ou doenças. Só se utilizaram folhas adultas do ano anterior. Em seguida, realizou-se a secagem das folhas em estufa a 50°C durante um período de 24 horas. Após o processo de desidratação as folhas foram embaladas em sacos plásticos e foram mantidas no escuro até a sua utilização.

3.2. Preparação das infusões/extratos

Para suceder à avaliação da atividade antioxidante das folhas de oliveira foram preparadas infusões/extratos em diferentes condições.

Inicialmente reduziu-se o tamanho das folhas manualmente, com o auxílio de uma tesoura até alcançar a granulometria desejada, de cerca de 3mm, das quais foram preparadas porções com 1g, 2g e 3g de folhas em 200 mL. Para tal, foi utilizado uma balança analítica RADWAG AS 220.R2, para pesar as diferentes porções de folha de oliveira. Após a pesagem das porções, foi feita a preparação de infusões com diferentes temperaturas, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C.

Para a preparação das infusões, foi utilizada água engarrafada da marca Luso, uma vez que se considera hiposalina. Em copos de 250 mL adicionaram-se 200 mL de água à temperatura desejada e em seguida, utilizando o filtro de chá de aço inoxidável, foram imersas as folhas que permaneceram em contato com a água à temperatura desejada durante 5 minutos. Após esse período esperou-se que as infusões arrefecessem até à temperatura ambiente, taparam-se os copos, e foram congelados. Para cada combinação de quantidade de folha e temperatura foram utilizadas três repetições para cada infusão.

Após o congelamento, as infusões foram colocadas no liofilizador (SCANVAC-CoolSafe) até liofilização completa. Avaliou-se o rendimento de extração em percentagem da liofilização.

3.3. Caracterização das infusões de folhas de oliveira da cv. Santulhana e sua atividade biológica

Em cada um dos extratos obtidos foi avaliado a composição em compostos fenólicos individuais por HPLC/DAD, a capacidade redutora total, o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), o método ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfónico], o poder redutor e os diferentes grupos fenólicos. Cada extrato foi avaliado em triplicado.

Posteriormente, foi preparada uma nova bateria de infusões, de acordo com o procedimento descrito, onde foi avaliada a fração volátil por GC/MS e se procedeu à análise sensorial com recurso a um painel de provadores treinados.

3.3.1. Determinação do perfil fenólico por HPLC/DAD

O perfil dos compostos fenólicos foi avaliado por cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography-HPLC), num equipamento com módulo de separação Knauer Smartline, com sistema de refrigeração definido a 4°C, um detector Knauer DAD e equipado com um amostrador automático Knauer Smartline 3800. Foi utilizada uma coluna C18 Spherisorb (250 x 4 mm id, partícula de 5 µm de diâmetro de extremidade) (Nucleosil Macherey-Nagel), em fase reversa, sendo mantida à 30°C. Como solvente utilizou-se um gradiente de água / ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B), que foram previamente filtrados a vácuo e degaseificados. A taxa do fluxo empregada foi de 0,9 mL/min com gradientes variando até aos 66 minutos de análise, 5% B aos 0 minutos, 15% B aos 3 minutos, 25% B aos 13 min, 30% B em 25 min, 35% B em 35 min, 40% B em 39 min, 45% B em 42 min, 45% B em 45 min, 47% B aos 50 minutos, 48% B aos 60 minutos, 50% B aos 64 minutos e 100% B aos 66 minutos.

Para realizar a análise, os extratos aquosos foram dissolvidos a uma concentração de 75mg/mL e todas as amostras foram filtradas em uma membrana de 0,2µm de Nylon (Whatman), sendo utilizado como volume de injeção 10 µL. Foram obtidos picos entre 200 e 400 nm. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros dos picos cromatográficos obtidos com os dos padrões autênticos analisados nas mesmas condições. Para quantificar os compostos fenólicos as absorvâncias registadas nos cromatogramas foram observadas e comparadas com as retas de calibração preparadas a partir de padrões externos.

3.3.2. Avaliação da capacidade redutora total

Para avaliação da capacidade redutora total nas amostras liofilizadas utilizou-se o método de Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. Dessa forma, em 1 mL das amostras, as várias concentrações, adicionou-se 1 mL do reagente de Folin e Ciocalteu (Adrich Chemistry) e foi feita agitação em vórtex, deixando reagir em repouso por 3 minutos. Depois de passado o tempo estimado, adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e 7 mL de água destilada agitando novamente a mistura.

A solução final foi deixada no escuro durante uma hora e meia, lendo-se em seguida absorvância no espectrofotómetro de ultravioleta e visível (Genesys™ 10 UV) a 725 nm.

Para obtenção dos dados finais, utilizou-se ácido gálico para calcular a curva de calibração e os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato (mg GAE g⁻¹ extrato).

3.3.3. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

O método de avaliação utilizado para detectar a capacidade de bloquear radicais livres de DPPH dos extratos de folhas de oliveira foi descrito por Hatano *et al.* (1988). Para isso, utilizou-se 0,3 mL das amostras nas concentrações predeterminadas, adicionou-se 2,7 mL da solução de DPPH (Adrich Chemistry) e em seguida a mistura foi agitada vigorosamente, e por fim as amostras ficaram no escuro por uma hora. A leitura espectrofotométrica foi feita a 517 nm e os resultados foram apresentados em percentagem de inibição do DPPH, que foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{A_{DPPH} * A_A}{A_{DPPH}} \times 100$$

sendo os valores de A_A correspondentes à absorvância da solução com o extrato da amostra e os valores de A_{DPPH} a absorvância da solução de DPPH (branco).

3.3.3.1. Atividade Sequestradora do Radical ABTS (ABTS^{•+})

A formação do radical ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] é a base de um dos métodos espectrofotométricos que tem sido aplicado para a medição da atividade antioxidante de produtos. A atividade sequestradora das folhas de oliveira da cv. Santulhana foi feita seguindo o método de Sánchez *et al.* (2007). Primeiramente, 25 mL da solução de ABTS^{•+} foi adicionada a 0,44 mL da solução de persulfato de potássio. Em seguida agitou-se a mistura e colocou-se no escuro por 16 horas. Para preparar a solução que foi usada na análise, dissolveu-se aos poucos a solução anterior em etanol absoluto, até à obtenção de uma absorvância de $0,70 \pm 0,02$, lida a $\lambda = 734\text{nm}$. O processo foi adicionar 2 mL da solução ABTS preparada e 0,1 mL da amostra com a concentração previamente determinada e agitar. Depois dessas etapas a leitura de cada amostra foi efetuada num espectrofotómetro UV/Visível modelo GenesysTM10 UV.

3.3.4. Determinação do Poder Redutor

Para realizar a avaliação do poder redutor dos extratos seguiu-se o método descrito por Berker *et al.* (2007). Dessa forma, foi empregada 1 mL da solução do extrato, adicionou-se 2,5 mL da solução tampão 0,2 M de fosfato de sódio com o pH de 6,6 e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) a 1%. A mistura formada foi agitada e incubada a 50°C por 20 minutos em banho-maria. Após o arrefecimento das amostras adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v), agitando vigorosamente. Foi retirado 2,5 mL do sobrenadante da mistura e adicionou-se 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de 0,1% de cloreto de ferro (III). Depois de pronta a mistura com todos os reagentes

necessários, esperou-se 2 minutos e a leitura para avaliação do poder redutor foi feita em absorvância de 700 nm.

3.3.5. Diferentes grupos fenólicos

A determinação dos diferentes grupos fenólicos foi efetuada seguindo o método de Boulanouar *et al.* (2013). A 1 mL de amostra com concentração 1 mg mL⁻¹ adicionou-se 1 mL de solução de EtOH 96%/ 0,1% HCl, em seguida o volume foi completado até 10 mL com a solução de HCl 2%. A absorvância das amostras foi medida a 280 nm para determinar fenóis totais utilizando ácido gálico como reagente padrão, a 320 nm para os derivados do ácido hidroxicinâmico e como padrão o ácido caféico e a 360 nm para determinar os flavonóis usando como padrão a quercetina, realizou-se as curvas de calibração e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes do respectivo padrão utilizado por grama de extrato, sendo mg GAE g⁻¹; mg CAE g⁻¹;mg QE g⁻¹.

3.4. Caracterização sensorial, fração volátil e taninos hidrolisáveis de infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana

3.4.1. Análise sensorial

A análise sensorial das infusões foi realizada por um painel treinado, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, constituído por cinco provadores. Todos os parâmetros avaliados nas diferentes infusões obtidas a partir de diferentes concentrações e temperaturas, estão de acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO 4121:2003, ISO 13299:2016, ISO 3103:2019), com algumas modificações. As infusões foram preparadas com diferentes quantidades nomeadamente 1, 2 e 3g de folhas de oliveira da cv. Santulhana, colocadas em 200mL de água a diferentes temperaturas de 60, 70 ,80, 90 e 100°C. Foram servidos cerca de 40mL de infusão aos provadores. Os parâmetros avaliados nas diferentes infusões foram avaliados quanto ao aspecto visual (coloração, intensidade de cor e turbidez), ao aroma (agradabilidade do aroma e intensidade do aroma), no paladar (intensidade do sabor, persistência, amargo, picante, adstringência e doce), e outras sensações de aroma e sabor, onde foi utilizada uma roda dos aromas de infusões como auxílio para os provadores. Todos esses parâmetros foram avaliados numa escala de 10cm não estruturada contínua de 0 a 10.

3.4.2. Perfil dos compostos voláteis

Foi avaliado o perfil dos compostos voláteis por HS-SPME (micro extração em fase sólida pelo espaço de cabeça) e GC-MS (cromatografia gasosa com detetor de massas) das infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana com diferentes temperaturas de preparação e concentrações das amostras.

Para extrair os compostos voláteis utilizou-se um vial de 50mL contendo 2 mL da amostra na qual adicionou-se 5µL de padrão interno 4-metil-2-pentanol com concentração de 150 ppm com uma fibra de SPME. Os compostos voláteis foram liberados para o *headspace* durante 5 minutos a 40°C e foram posteriormente absorvidos pela fibra de SPME durante um período de 30 minutos na mesma temperatura, depois da extração a fibra foi recolhida e inserida no injetor de um sistema de cromatografia gasosa. O procedimento no equipamento de HS-SPME foi realizado em triplicado para cada amostra e a metodologia aplicada foi adaptada de Malheiro *et al.* (2017).

A detecção e quantificação dos voláteis foram feitas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 Plus equipado com um detector de massas Shimadzu GC/MS-QP2010 SE e uma coluna a coluna TRB-5MS (30 m × 0.25mm × 0.25µm) (Teknokroma, Spain). A temperatura do injetor foi programada para 220°C e as injeções foram realizadas manualmente em modo *splitless*, a fase móvel utilizada consistia em hélio (Praxair, Portugal) programada a uma velocidade linear de 30 cm/s e um fluxo total de 24,4 mL.min⁻¹. As temperaturas do forno foram estabelecidas da seguinte forma: 40 °C durante o primeiro minuto, com um aumento posterior de 2 °C por 32 minutos até alcançar os 220 °C, e mantida a esta temperatura durante 30 minutos. A temperatura da fonte de ionização foi mantida a 250°C com energia e corrente de ionização de 70 V e 0,1 kV respectivamente e os espectros de massa dos compostos foram obtidos por meio de ionização eletrônica, que foi automaticamente desligada durante os três primeiros minutos de cada corrida. Os espectros de massa obtidos foram comparados com os compostos padrão e com os valores obtidos na base de dados (NIST 11).

Os compostos identificados após a realização da análise foram quantificados através da integração dos cromatogramas, que foram reconstruídos a partir de um cromatograma full *scan* com a utilização do íon de base de cada composto (m/z 100% de intensidade). Para a obtenção das quantidades de compostos identificados calculou-se a área de cada composto e realizou-se o cálculo para expressar os resultados em percentagem relativa do composto na amostra. Para tal, utilizou-se a área calculada de cada composto dividindo-a pela área total do cromatograma, diminuindo da área do padrão interno e multiplicou-se por cem, conforme o mostrado na seguinte equação:

$$\% \textit{ relativa do composto} = \frac{A_C}{A_{TC} - A_{PI}} \times 100$$

sendo o valor de A_C correspondente a área individual de cada composto identificado, A_{TC} a área total do cromatograma e A_{PI} a área do padrão interno que foi adicionado à amostra.

3.4.3. Taninos hidrolisáveis

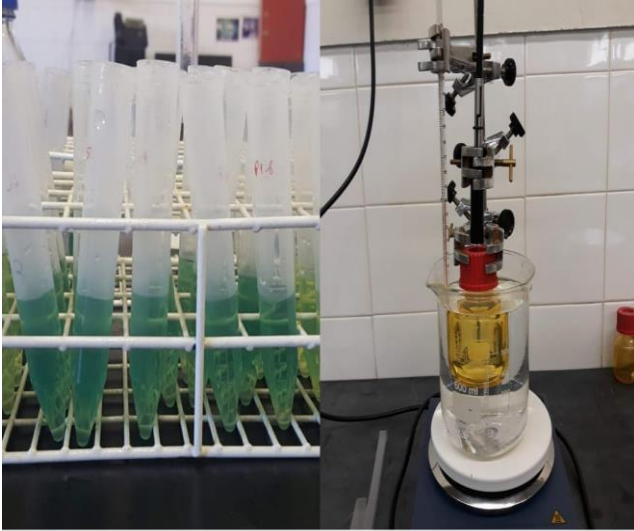
O teor dos taninos hidrolisáveis das folhas de oliveira em estudo foi determinado pelo método descrito por Elfalleh *et al.* (2012). A 1 mL da solução do extrato das folhas liofilizadas em concentração de 10 mg/mL, foi adicionado 5 mL de 2,5% KIO₃ e misturou-se a solução no vórtex durante 10 segundos. A absorvância das amostras preparadas foi medida a 550 nm, sendo o branco

utilizado apenas água, que é o solvente utilizado na dissolução dos extratos. Para a curva de calibração, foram utilizadas concentrações diferentes de solução de ácido tânico (0,03125 a 0,5 mg mL⁻¹). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg TAE g⁻¹ extrato).

3.5. Análise estatística

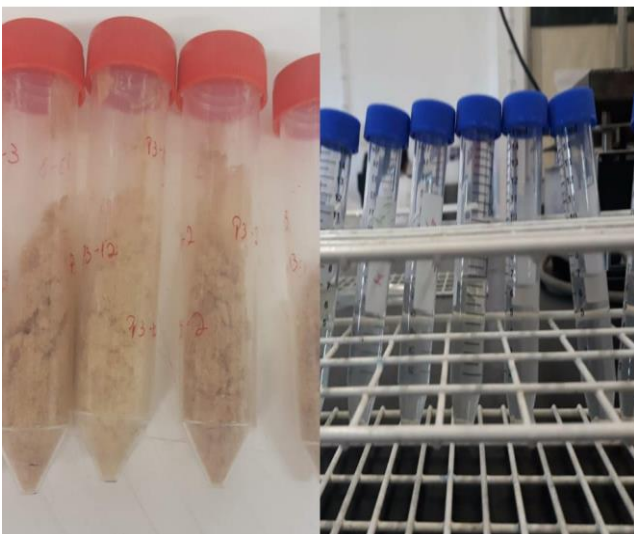
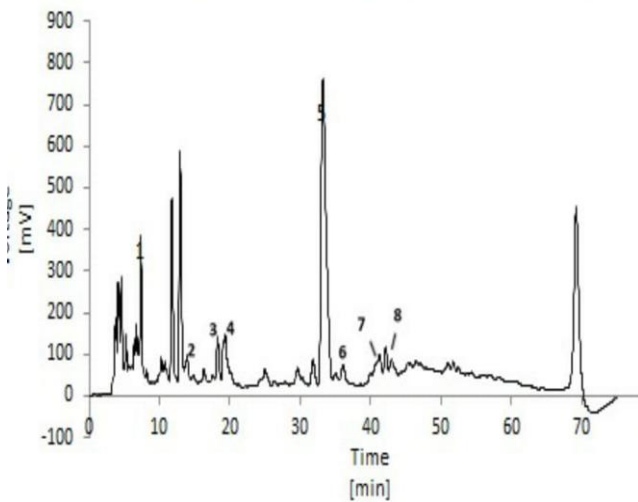
Para a determinação da atividade antioxidante e da composição fenólica das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana foram utilizadas três repetições para cada tratamento aplicado, realizando em cada uma das infusões a leitura em triplicado. Os resultados estão apresentados em médias com os seus respectivos desvios padrão.

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS Statistics, versão 20.0 (Armonk, NY: IBM Corp). A homogeneidade e a normalidade foram verificadas pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk. As variáveis dependentes foram avaliadas, e quando observadas normalidade e homogeneidade empregou-se a análise de variância (ANOVA) fator único, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. E quando foi observada a normalidade dos dados, mas não a homogeneidade das variâncias, aplicou-se o teste ANOVA Welch, seguida do teste *post-hoc* de Games-Howell.



Capítulo 4

Resultados e discussão



4. Resultados e discussão

Foram diversos parâmetros determinados para avaliar a composição química das diferentes infusões preparadas a partir da folha de oliveira da cv. Santulhana com o objetivo de verificar qual o efeito da temperatura e da quantidade de folha adicionada nas diferentes infusões. Em seguida apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos.

4.1. Rendimento de extração

Os rendimentos de extração obtidos da liofilização das infusões preparadas a partir de diferentes condições estão expostos na tabela 6. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que a temperatura e a concentração influenciaram os rendimentos. Observando os resultados da tabela 6, pode-se verificar que o rendimento da extração apresentou uma correlação mais efetiva com as diferentes concentrações de folhas utilizadas, tendo pouca influência das variadas temperaturas.

Tabela 6: Rendimento de extração das infusões

Rendimento de extração (%)						
Concentração (g)	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C	p-valor
P1	24,7±4,4 ^{aB}	24,0±3,7 ^{aA}	21,2±5,1 ^{aB}	39,7±16,5 ^{aB}	30,9±14,2 ^{aA}	NS
P2	11,9±0,2 ^{aA}	26,9±6,4 ^{bA}	23,2±1,8 ^{abB}	19±1,3 ^{abAB}	29,2±7,2 ^{bA}	**
P3	11,4±2,6 ^{aA}	15,3±3,2 ^{aA}	11,2±3,5 ^{aA}	14,3±2,8 ^{aA}	12,6±3,5 ^{aA}	NS
p-valor	**	NS	*	*	NS	

P1- infusão com 1g de folha; **P2**- infusão com 2g de folhas; **P3**- infusão com 3g de folhas

As médias com letras diferentes e maiúscula indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

As médias com letras diferentes e minúscula indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

NS Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e não foram verificadas diferenças com efeito significativo ($p > 0,05$).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($0,01 < p < 0,05$) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,01$) foi aplicado o teste de Games-Howell.

***Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,001$) foi aplicado o teste de Games-Howell

De todas as quantidades e temperaturas estudadas, verificou-se que as infusões com 1g de folhas apresentaram maior rendimento de extrato, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$) em relação as diferentes temperaturas utilizadas. Observou-se o mesmo comportamento para as infusões com 3g de folhas, porém com um rendimento menor. Os resultados obtidos mostram que com uma quantidade de 3g de folha para 200 mL de água provavelmente provoca saturação da infusão reduzindo a eficiência da extração, o que indica que não será por termos maior quantidade de folha que aumentará a quantidade de extrato obtido.

Estatisticamente, comparando os valores obtidos entre as concentrações, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nas temperaturas de 70°C e 100°C. No geral, para o rendimento da extração das infusões, as concentrações utilizadas expressaram maior influência do

que as diferentes temperaturas, sendo assim, o rendimento da liofilização se mostrou mais eficiente para as infusões com 1g de folhas.

4.2. Determinação do perfil fenólico

Na determinação do perfil fenólico das infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana por HPLC/DAD, foram identificados e quantificados oito compostos nomeadamente hidroxitirosol glicol, ácido clorogénico, ácido cafeico, verbascosídeo, oleuropeína, rutina, apigenina-7-*O*-glucósido e luteolina (Figura 2).

Todos compostos identificados pertencem às principais classes de compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos, flavonóides, álcoois fenólicos e secoiridóides e estão de acordo com os resultados obtidos em trabalhos sobre folhas de oliveira de diferentes cultivares, que identificaram compostos fenólicos, entre eles, ácido gálico, hidroxitirosol, quercetina, tirosol, rutina, ácido clorogénico, catequina, ácido vanílico, oleuropeína, apigenina, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido cinâmico (Brahmi *et al.*, 2013; Ghomari *et al.*, 2019).

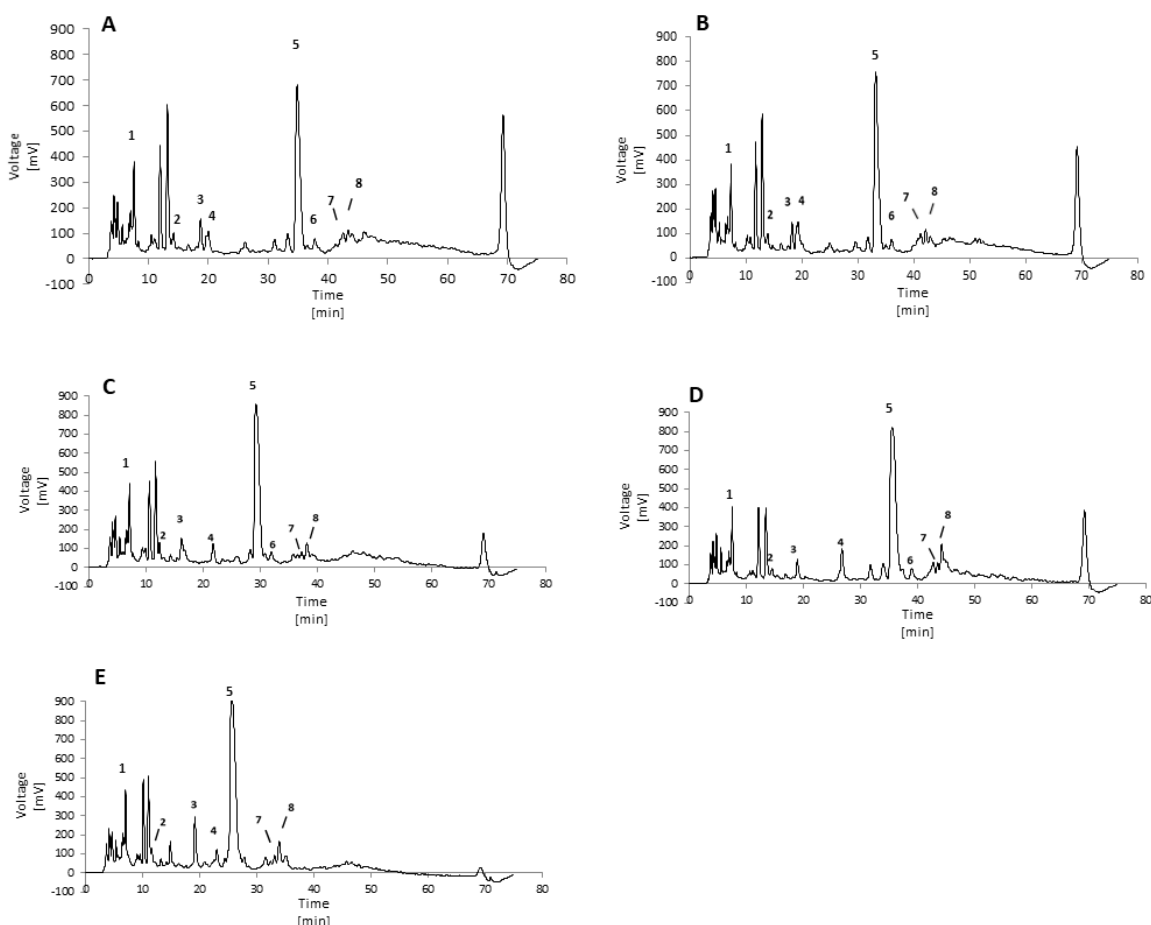


Figura 2: Cromatogramas (HPLC) do perfil fenólico das infusões de folha de oliveira. Detecção a 254 nm: (A) Infusão a 60°C; (B) Infusão a 70°C; (C) Infusão a 80°C; (D) Infusão a 90°C; (E) Infusão a 100°C; (1) hidroxitirosol glicol; (2) Ácido clorogénico; (3) Ácido cafeico; (4) Verbascosídeo; (5) Oleuropeína; (6) Rutina; (7) Apigenina-7-*O*-glucósido; (8) Luteolina.

A quantificação dos compostos fenólicos identificados foi feita através de retas de calibração com padrões externos e as concentrações determinadas nas amostras de infusões de folha de oliveira estão expostas na tabela 7. Os valores das concentrações estão expressos em mg/g de extrato, o total de compostos fenólicos das infusões variou de acordo com as formas de preparo empregues, as amostras com 3g de folhas foram as que forneceram os menores valores, comparativamente às demais concentrações.

Tabela 7: Composição fenólica das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana expressa em miligrama por grama de extrato.

		Temperaturas				
		60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
Hidroxitirosol glicol	P1	0,48±0,12	0,10±0,03	0,09±0,04	0,26±0,09	0,68±0,44
	P2	0,03±0,01	0,09±0,04	0,16±0,09	0,29±0,01	0,19±0,05
	P3	0,02±0,01	0,05±0,01	0,07±0,03	0,12±0,03	0,10±0,03
Ácido Clorogénico	P1	0,07±0,01	0,05±0,00	0,04±0,01	0,12±0,05	0,06±0,03
	P2	0,02±0,00	0,05±0,02	0,06±0,02	0,04±0,00	0,07±0,02
	P3	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01
Ácido Cafeico	P1	0,06±0,01	0,16±0,04	0,09±0,01	0,08±0,03	0,45±0,20
	P2	0,09±0,01	0,27±0,13	0,10±0,07	0,09±0,02	0,53±0,16
	P3	0,09±0,02	0,14±0,04	0,03±0,00	0,24±0,07	0,19±0,05
Verbascosídeo	P1	0,69±0,21	0,46±0,09	0,48±0,14	2,00±1,00	0,20±0,07
	P2	0,24±0,01	0,30±0,14	0,48±0,34	0,74±0,17	0,30±0,10
	P3	0,21±0,03	0,36±0,10	0,24±0,08	0,27±0,07	0,23±0,05
Oleuropeína	P1	30,25±3,90	37,07±5,60	36,34±13,24	87,82±35,27	56,36±28,28
	P2	17,31±2,47	33,99±12,54	41,91±10,03	46,68±5,30	66,30±17,94
	P3	13,36±3,04	24,07±3,53	22,44±7,35	35,80±8,12	30,12±8,53
Rutina	P1	0,14±0,02	0,22±0,07	0,21±0,07	0,60±0,28	n.d
	P2	0,08±0,01	0,21±0,08	0,19±0,09	0,14±0,06	n.d
	P3	0,05±0,01	0,10±0,02	0,11±0,03	0,04±0,02	n.d
Apigenina-7-O-gluc	P1	0,07±0,01	0,06±0,02	0,04±0,01	0,22±0,10	0,06±0,03
	P2	0,09±0,01	0,06±0,02	0,04±0,01	0,12±0,06	0,07±0,02
	P3	0,08±0,02	0,04±0,01	0,08±0,04	0,14±0,03	0,12±0,03
Luteolina	P1	0,07±0,02	0,05±0,01	0,06±0,03	0,19±0,10	0,19±0,16
	P2	n.d	0,13±0,04	0,17±0,04	0,17±0,02	0,26±0,09
	P3	0,07±0,02	0,17±0,04	0,09±0,03	0,17±0,05	0,12±0,02
Total	P1	31,84±10,62	38,18±13,05	37,34±12,80	91,27±30,88	58,00±21,20
	P2	17,88±6,51	35,10±11,96	43,11±14,76	48,27±16,43	67,73±24,97
	P3	13,90±4,70	24,98±8,46	23,09±7,90	36,81±12,61	30,92±11,34

Valores médios da quantificação dos compostos fenólicos das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana (média±dp)

P1- infusão com 1g de folha; **P2**- infusão com 2g de folhas; **P3**- infusão com 3g de folhas

n.d Composto não detectado.

Para a discussão dos resultados dos compostos fenólicos, decidiu-se utilizar as percentagens mássicas de cada composto (tabela 8) como forma de entender de que modo a temperatura e ou a quantidade pode influenciar cada composto. Verificou-se que as diferentes infusões, apresentam elevadas quantidades de compostos extraídos. Contudo, nos resultados obtidos não foi verificada uma correlação homogênea entre as concentrações e temperaturas utilizadas. Dos compostos identificados, a oleuropeína foi o composto maioritário com uma percentagem que variou entre 95 e 98% nas diferentes temperaturas e quantidades de folha. Os resultados obtidos estão de acordo com o trabalho feito por Ghomari *et al.* (2019), que estudou o perfil fenólico de folhas de oliveira de acordo com o procedimento de extração, e também identificou a oleuropeína como sendo o principal composto presente nas folhas de oliveira, para extrações realizadas com água destilada e metanol 80%.

Para a infusão com 1g de folhas, a menor percentagem obtida foi na temperatura de 60°C ($95,06 \pm 0,66\%$), sendo diferente estatisticamente das outras temperaturas que apresentaram percentagens ligeiramente mais altas. Nas temperaturas de 70°C e 80°C a quantidade de oleuropeína extraída na infusão não apresentou diferença estatisticamente significativa a um nível de 5% de probabilidade e a 90°C e 100°C as percentagens obtidas estão próximas, ou seja, é um composto que se consegue extrair a temperaturas altas e medianas, conforme mostra o estudo de Malik e Bradford (2008) sobre a recuperação e estabilidade da oleuropeína e outros polifenóis em folhas de oliveira, e o comportamento nas demais concentrações, de 2 e 3g, foi similar ao citado anteriormente.

Ao realizar a comparação entre as quantidades de folhas utilizadas, não foi observada diferença estatística significativa em duas das temperaturas estudadas, a 70°C, na qual a percentagem extraída foi de $97,12 \pm 0,25$, $96,76 \pm 0,21$ e $96,39 \pm 0,42$ e 80°C com os valores de $97,23 \pm 0,31$, $97,27 \pm 1,04$ e $97,23 \pm 0,07$ para as concentrações de 1, 2 e 3g, respectivamente. Nessas temperaturas, nota-se que a quantidade de oleuropeína não está diretamente relacionada com a concentração. Os valores obtidos estão de acordo com González *et al.* (2019), que mesmo com a utilização de métodos diferentes de extração, seus estudos apontam a oleuropeína como composto maioritário contabilizando 85% de todos os compostos identificados, seguido do hidroxitirosol glicosídeo e verbascosídeo.

O segundo composto mais representativo das infusões é o verbascosídeo onde observou-se valores percentuais variando de 0,36 a 2,14%. O aumento da temperatura mostrou diminuição na quantidade extraída de verbascosídeo, para a infusão com menor concentração nas temperaturas de 60°C e 100°C foram obtidas as percentagens de $2,14 \pm 0,39$ e $0,36 \pm 0,09$, respectivamente. O terceiro composto presente em maior proporção foi o ácido cafeico, com variação de 0,09 a 0,8%, que ao contrário do citado acima, obteve um ligeiro aumento com a elevação da temperatura com valores de $0,20 \pm 0,01$ para 60°C e $0,78 \pm 0,08$ a 100°C. Resultados semelhantes foram apresentados por Altok *et al.* (2008), Özcan *et al.* (2017) e Xie *et al.* (2015), na quantificação de compostos fenólicos individuais

em extratos de folha de oliveira também tendo a oleuropeína como principal composto, verificando-se valores de 6,53 mg g⁻¹ para a oleuropeína, seguido do ácido cafeico (2,71 mg g⁻¹) e verbascosídeo (0,83 mg g⁻¹), os outros compostos identificados tinham apenas traços presentes nas amostras.

No que se refere às formas de preparo das infusões e extração dos compostos, a utilizada no estudo está conforme o preparo tradicional de saquetas de chá e o estudo feito por Japón-Luján e Luque de Castro (2006), utilizando variadas formas de extração, verificou com a análise HPLC/DAD que o composto detectado com maior concentração está de acordo com os resultados obtidos. Em primeiro a oleuropeína seguido do verbascosídeo, além disso, foi concluído que a folha é uma fonte potencial de compostos bioativos de baixo custo, pois são subprodutos da produção de azeite e azeitona de mesa, além dos métodos e materiais utilizados serem simples.

No estudo feito por Malik e Bradford (2006), o verbascosídeo estava ausente nas folhas jovens, porém foi detectado nas folhas maduras em concentração de 0.66±0.02 mg g⁻¹ folha fresca, sendo assim, a escolha da utilização de folhas maduras no estudo em questão foi correta, uma vez que as folhas jovens podem ser deficientes de alguns compostos fenólicos, uma vez que a sua identificação e quantificação eram os objetivos do estudo.

Tabela 8: Composição fenólica das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana expressa em percentagem mássica.

		Temperaturas					Valor de p
		60°C	70°C	80°C	90°C	100°C	
Hidroxitirosol glicol	P1	1,51±0,20 ^{bB}	0,27±0,05 ^{aAB}	0,22±0,05 ^{aA}	0,29±0,03 ^{aA}	1,12±0,18 ^{bA}	**
	P2	0,18±0,03 ^{aA}	0,27±0,00 ^{aB}	0,38±0,20 ^{abA}	0,61±0,06 ^{bB}	0,29±0,01 ^{aB}	**
	P3	0,16±0,01 ^{aA}	0,21±0,01 ^{bA}	0,31±0,02 ^{cA}	0,33±0,02 ^{cA}	0,34±0,01 ^{cC}	***
		**	**	NS	***	***	
Ácido Clorogénico	P1	0,21±0,01 ^{bA}	0,14±0,01 ^{aA}	0,11±0,02 ^{aA}	0,13±0,01 ^{aB}	0,11±0,01 ^{aA}	**
	P2	0,14±0,02 ^{bB}	0,14±0,00 ^{bA}	0,14±0,03 ^{bAA}	0,08±0,00 ^{aA}	0,10±0,00 ^{abA}	**
	P3	0,19±0,01 ^{cA}	0,14±0,01 ^{bA}	0,14±0,02 ^{bA}	0,10±0,00 ^{aA}	0,11±0,01 ^{aA}	***
		**	NS	NS	**	NS	
Ácido Cafeico	P1	0,20±0,01 ^{abB}	0,42±0,08 ^{cA}	0,27±0,09 ^{bcA}	0,09±0,00 ^{aA}	0,78±0,08 ^{dB}	***
	P2	0,53±0,07 ^{bA}	0,75±0,15 ^{cB}	0,23±0,11 ^{aA}	0,18±0,04 ^{aB}	0,78±0,05 ^{cB}	***
	P3	0,63±0,04 ^{bA}	0,57±0,08 ^{bAB}	0,15±0,03 ^{aA}	0,64±0,05 ^{bC}	0,62±0,01 ^{bA}	***
		***	**	NS	***	*	
Verbascosídeo	P1	2,14±0,39 ^{cB}	1,19±0,07 ^{bAB}	1,31±0,13 ^{bA}	2,12±0,33 ^{cA}	0,36±0,09 ^{aA}	***
	P2	1,38±0,14 ^{bA}	0,84±0,15 ^{cA}	1,06±0,69 ^{bcA}	1,53±0,29 ^{bcA}	0,43±0,05 ^{aA}	**
	P3	1,50±0,11 ^{bA}	1,43±0,21 ^{bB}	1,03±0,04 ^{aA}	0,72±0,07 ^{aB}	0,76±0,06 ^{aB}	***
		*	**	NS	**	*	
Oleuropeína	P1	95,06±0,66 ^{aA}	97,12±0,25 ^{bA}	97,23±0,31 ^{bA}	96,30±0,34 ^{bA}	97,22±0,11 ^{bA}	***
	P2	96,82±0,19 ^{aB}	96,76±0,21 ^{aA}	97,27±1,04 ^{abA}	96,72±0,15 ^{aA}	97,91±0,07 ^{bB}	***
	P3	96,05±0,18 ^{aAB}	96,39±0,42 ^{aA}	97,23±0,07 ^{bA}	97,27±0,17 ^{bB}	97,39±0,13 ^{bA}	***
		**	NS	NS	*	*	
Rutina	P1	0,45±0,01 ^{aA}	0,57±0,12 ^{abA}	0,57±0,02 ^{bA}	0,64±0,08 ^{bB}	n.d	***
	P2	0,46±0,03 ^{abA}	0,60±0,09 ^{bA}	0,43±0,17 ^{abA}	0,28±0,10 ^{aA}	n.d	***
	P3	0,38±0,07 ^{bA}	0,40±0,04 ^{bA}	0,46±0,07 ^{bA}	0,11±0,03 ^{aA}	n.d	***
		NS	NS	NS	**		
Apigenina-7-O-gluc	P1	0,22±0,01 ^{bA}	0,15±0,02 ^{aA}	0,10±0,03 ^{aA}	0,23±0,03 ^{bA}	0,10±0,01 ^{aA}	***
	P2	0,50±0,01 ^{bB}	0,18±0,04 ^{aA}	0,08±0,02 ^{aA}	0,25±0,14 ^{aAB}	0,10±0,02 ^{aA}	***
	P3	0,61±0,03 ^{cC}	0,17±0,03 ^{aA}	0,32±0,07 ^{bB}	0,37±0,02 ^{bB}	0,37±0,01 ^{bB}	***
		***	NS	**	**	***	
Luteolina	P1	0,23±0,03 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aA}	0,19±0,10 ^{aA}	0,20±0,05 ^{aA}	0,31±0,18 ^{aA}	NS
	P2	n.d	0,38±0,07 ^{aB}	0,39±0,06 ^{aB}	0,34±0,01 ^{aB}	0,38±0,05 ^{aA}	NS
	P3	0,49±0,05 ^{aB}	0,68±0,05 ^{bC}	0,37±0,00 ^{aB}	0,46±0,05 ^{aC}	0,40±0,06 ^{aA}	***
Valor de p		***	***	*	***	NS	

P1- infusão com 1g de folha; **P2**- infusão com 2g de folhas; **P3**- infusão com 3g de folhas

As médias com letras diferentes e maiúscula indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

As médias com letras diferentes e minúscula indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

n.d Composto não detectado.

NS Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e não foram verificadas diferenças com efeito significativo ($p > 0,05$).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($0,01 < p < 0,05$) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,01$) foi aplicado o teste de Games-Howell.

***Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,001$) foi aplicado o teste de Games-Howell

Em relação ao hidroxitirosol glicol, foi identificado e quantificado em todas as amostras em estudo. O seu conteúdo variou de $0,16 \pm 0,01$ para infusão com 3g, a $1,51 \pm 0,20$ para infusão de 1g, ambos na temperatura de 60°C . Esse composto está presente não somente nas folhas da oliveira, mas também nas azeitonas frescas, azeites em águas ruças (Mendes, 2012).

No que respeita aos demais compostos, nomeadamente, o ácido clorogénico, luteolina, apigenina-7-O-glucósido e rutina foram os presentes em menor quantidade em todas as infusões analisadas. Para a rutina, um flavonóide, seus resultados mostram entre as diferentes concentrações e nas temperaturas de $60,70$ e 80°C não existem diferenças estatísticas ($p < 0,001$). Já a 90°C , a diferença entre os valores foi notável, sendo eles, $0,64 \pm 0,08$ (1g), $0,28 \pm 0,10$ (2g) e $0,11 \pm 0,03$ (3g), expressando uma diminuição da percentagem de extração de acordo com o aumento da quantidade de folhas nas infusões. Na maior temperatura utilizada (100°C), a rutina não foi detectada considerando a hipótese de que na temperatura utilizada pelos consumidores para a preparação das infusões esse composto se degrada. Além de estar presentes em infusões de folhas de oliveira, a rutina foi identificada nos estudos de Silva *et al.* (2006), em extratos de pasta de azeitona e em extratos de folhas de oliveira.

O ácido clorogénico, um ácido fenólico, foi quantificado em todas as infusões com valores baixos, nas temperaturas de $70, 80$ e 100°C , não foi observada diferença estatística entre as concentrações, ou seja, a quantidade extraída nas amostras foi considerada igual. Para as infusões preparadas a 90°C a percentagem da amostra com 2g de folhas foi a menor obtida (0,08%), enquanto nas concentrações de 1 e 3g os valores foram de 0,13% e 0,10%, respectivamente. Este composto é considerado importante como sinal fisiológico da periodicidade da oliveira, mais presente na época de floração e frutificação. O acúmulo desse composto ocorre nos meses de Julho e Agosto (Mert *et al.*, 2013), assim sendo, os baixos valores obtidos no estudo em questão estão de acordo com o mostrado na literatura, uma vez que, as folhas foram coletadas no mês de Março.

Diferenças assinaláveis foram observadas para os valores obtidos para a luteolina, um flavonóide com propriedades antioxidantes e um dos compostos minoritários das infusões. A sua percentagem variou de 0,10% a 0,68%. À temperatura de 60°C , para a infusão com 2g de folhas, não foi possível identificar e quantificar esse composto, e para as demais temperaturas não houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$), sendo assim, para essa concentração a temperatura não influenciou na quantidade extraída de luteolina. Para as demais concentrações, foi possível quantificar a luteolina a 60°C e os valores foram de 0,23% (1g) e 0,49% (3g) e com isso, observa-se que o aumento da concentração, eleva ligeiramente a presença desse composto na infusão, por exemplo, para a temperatura de 90°C houve diferença estatística ($p < 0,001$), sendo os valores obtidos de 0,20%, 0,34% e 0,46%, para as infusões de 1,2 e 3 g, respectivamente.

Comparativamente ao estudo feito por Silva *et al.* (2006), na identificação de compostos fenólicos em extratos e infusões de folha de oliveira da cv. Negrinha de Freixo, da região de Trás-os-

Montes, foram também identificados e quantificados oito compostos. Além disso, foi observada similaridade entre os cromatogramas obtidos das infusões e dos extratos, mas apesar da analogia, as infusões apresentaram maiores níveis em compostos fenólicos comparativamente com os extratos de folhas secas, a extração com água quente realizada nas infusões elevou a quantidade de certos compostos em relação a extração feita com água:metanol. Para tal, as infusões com folhas de oliveira da cv. Santulhana, também apresentaram quantidade significativa dos compostos identificados equivalente ao demonstrado por Silva *et al.* (2006).

É notório, que as amostras das infusões de folhas de oliveira que foram submetidas às análises apresentaram diferenças consideráveis em relação à quantidade individual de compostos (Tabela 8) em cada tratamento aplicado. Os compostos fenólicos identificados e quantificados nas folhas de oliveira da cv. Santulhana podem estar relacionados com o grau de exposição da oliveira ao sol e à quantidade de água durante o período de vegetação, por esse motivo, a composição fenólica difere entre as cultivares, época de colheita, solo e condições edafoclimáticas (Teleszko & Wojdyło, 2015). Além disso, outros aspectos agronômicos, tratamento aplicado nas folhas antes do preparo das infusões, o tempo de contato da folha com a água e a granulometria são fatores que se relacionam com a composição fenólica das infusões.

4.3. Atividade antioxidante das folhas de oliveira da cv. Santulhana

A capacidade antioxidante de produtos de origem natural é uma especificação muito importante para estabelecer seus possíveis benefícios para a saúde, e como são determinadas a partir de diversos tipos de compostos, é imprescindível a avaliação da atividade por diferentes métodos (Pisoschi *et al.*, 2016). Apresentam-se de seguida os resultados para os diferentes métodos utilizados

4.3.1. Capacidade redutora total

Na Tabela 9 estão expostos, os resultados da capacidade redutora total avaliada nas diferentes amostras expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato. Os valores obtidos para os tratamentos aplicados nas infusões das folhas da cv. Santulhana foram variados mesmo tendo utilizado a mesma forma de extração, alterando apenas as temperaturas e concentrações.

Verificou-se que a capacidade redutora total variou de 63,40 a 133,41 mg GAE g extrato⁻¹ sendo a menor na amostra com 1g a 60°C e a maior na mesma concentração, mas na temperatura de 80°C. Observou-se também, para as infusões preparadas a 90°C um crescimento de acordo com o aumento da concentração, esse aumento ocasionou uma elevação no teor dos compostos fenólicos, sendo observada diferença estatística ($p < 0,001$) para a amostra com maior concentração. Os

resultados obtidos foram 91,67±5,17, 87,23±3,70 e 114,67±3,33 mg GAE g extrato⁻¹, para 1, 2 e 3g de folhas adicionadas nas infusões, respectivamente.

Na temperatura de 100°C, a mais utilizada pelos consumidores para a preparação de infusões, não foi observada diferença estatística significativa (p>0,05) entre os valores obtidos nas diferentes concentrações, e pode-se dizer a utilização de apenas 1g de folhas em 200 mL de água é o suficiente para a obtenção dos compostos bioativos presentes nas folhas de oliveira, e notou-se que a 70°C e 80°C os valores obtidos foram maiores para a concentração de 1g de folhas em 200mL de água. Essas diferenças estão de acordo com o estudo de Molan *et al.* (2009), o qual sugere que as condições de extração, como a proporção de folhas e água, temperatura de extração são parâmetros importantes e que afetam o teor de compostos fenólicos em uma magnitude significativa.

Tabela 9: Valores médios da capacidade redutora total.

Capacidade redutora total (mg GAE g extrato ⁻¹)				
	P1	P2	P3	Valor de p
60°C	63,40±3,03 ^{aA}	122,78±9,79 ^{cB}	80,86±5,24 ^{bA}	***
70°C	127,63±7,69 ^{bC}	84,71±9,21 ^{aA}	88,73±3,48 ^{aB}	***
80°C	133,41±20,33 ^{bC}	90,44±3,55 ^{aA}	89,69±6,83 ^{aB}	***
90°C	91,67±5,17 ^{aB}	87,23±3,70 ^{aA}	114,67±3,33 ^{bD}	***
100°C	94,46±7,60 ^{aB}	96,12±7,57 ^{aA}	99,20±3,56 ^{aC}	NS
Valor de p	***	***	***	

P1- infusão com 1g de folha; **P2**- infusão com 2g de folhas; **P3**- infusão com 3g de folhas

As médias com letras diferentes e maiúscula indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si (p<0,05)

As médias com letras diferentes e minúscula indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si (p<0,05)

NS Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e não foram verificadas diferenças com efeito significativo (p>0,05).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (0,01<p<0,05) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,01) foi aplicado o teste de Games-Howell.

***Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,001) foi aplicado o teste de Games-Howell

Para as infusões com a maior concentração, a avaliação da capacidade redutora total realizada identificou níveis mais elevados na temperatura de 90°C, identificando-a como a ideal para a preparação das infusões. Analogamente, um estudo realizado por Molan *et al.* (2009) com chá verde, o aumento da temperatura de preparação do chá fez com que os valores relacionados ao teor total de compostos fenólicos também aumentassem e foi estudado além das concentrações, o tempo de extração, que aos 5 minutos, mesmo tempo utilizado no estudo em questão, e a 100°C, obteve-se 78.8±0.27 mg GAE g matéria seca⁻¹.

Para esse parâmetro, as infusões com 2g de folhas apresentaram maiores valores na temperatura de 60°C (122,78±9,79 mg GAE g extrato⁻¹) e a 100°C (96,12±7,57 mg GAE g extrato⁻¹)

¹), apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,001$). Os valores obtidos para as temperaturas de 70, 80 e 90°C foram considerados iguais ($p < 0,001$), essa relação mostra que para essa quantidade de folhas, a temperatura que mais influencia na capacidade redutora total da infusão é a de 60°C. Já na concentração de 3g o maior valor da capacidade redutora foi para a temperatura de 90°C ($114,67 \pm 3,33$ mg GAE g extrato⁻¹) e o menor para 60°C ($80,86 \pm 5,24$ mg GAE g extrato⁻¹), inversamente ao ocorrido nas infusões com 2g. Esse comportamento em relação à temperatura está de acordo com o estudo de Kamran *et al.*, (2015), o aumento da temperatura eleva a capacidade redutora total, possivelmente pela ação do calor nas estruturas celulares das folhas de oliveira libertando os biofenóis para as infusões.

Alguns fatores podem influenciar na capacidade redutora total, como o tipo de extração e o pré-tratamento realizado nas folhas, os valores da tabela 9 foram obtidos a partir de infusões preparadas com folhas de oliveiras secas a 50°C e com granulometria de 3 mm, e Difonzo *et al.* (2017) realizou um estudo para avaliar a melhor combinação entre o processo de secagem da folha e o solvente utilizado na extração e os resultados mostraram que independentemente do solvente utilizado na extração, o efeito da desidratação das folhas obteve melhores valores para as folhas secas ao ar quente seguido das liofilizadas e folhas frescas.

Além disso, estudos realizados por Mello *et al.* (2012) caracterizaram o potencial antioxidante de folhas de oliveira, e para o fator da capacidade redutora total, as folhas *in natura* apresentaram uma concentração inferior aos das amostras de folhas processadas, o que possivelmente é devido à dificuldade de extração dos compostos em meio aquoso e à presença mais elevada de fenóis condensados, o que não acontece nas folhas que passaram pelo processo de beneficiamento, que torna os fenóis simples na forma não ligada. Sendo assim, as folhas que passam por processos para industrialização de infusões, apresentam teores mais altos, por exemplo, de fenóis totais o que possibilita torná-los mais benéficos para o consumidor.

Apesar de existirem formas conhecidas da maneira de ação da atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos na folha de oliveira, a forma do extrato e o tipo de solvente são fatores de interferência que ainda estão sendo investigados cientificamente (Nashwa & Abdel-Aziz, 2014). E como o consumo dos compostos bioativos das folhas de oliveira da forma mais natural pode ser uma tendência, uma vez que o aparecimento cada vez mais frequente de doenças crônicas faz com que os consumidores se tornem mais preocupados com a saúde e busquem maneiras e fontes alimentares que trazem benefícios à saúde. Estudos mais aprofundados sobre esses compostos e como agem no organismo ainda precisam ser realizados.

4.3.2. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Os valores referentes à percentagem de inibição do efeito bloqueador são apresentados na Tabela 10. Esta análise é comumente utilizada para avaliação da atividade antioxidante em alimentos, uma vez que o DPPH é um composto no qual possui estabilidade em uma absorção de no máximo entre 515 e 517nm (Mendes, 2012). A sua utilização para avaliação dos antioxidantes dá-se pelo fato de quando há presença dos compostos fenólicos o radical livre do DPPH é reduzido a 2,2-difenil-1-hidrazina ou uma hidrazina análoga fazendo com que a coloração violeta original da solução se torne amarelada. Essa mudança de cor ocorre devido à doação de elétrons e eliminação de radicais livres durante a reação e o tempo da diminuição da absorvância avalia o potencial do antioxidante, quanto mais rápido ocorre a diminuição, mais potente é o composto presente no extrato (Ferreira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007).

A percentagem de inibição do radical DPPH para os tratamentos aplicados nas amostras variou de 86 a 90%, para a infusão com 1g de folhas foi observada diferença estatística ($0,01 < p < 0,05$) entre os valores, tendo o maior valor sido obtido à 90°C. Para a concentração de 2g de folhas em 200 mL de água, a menor percentagem de inibição está na temperatura de 60°C (88,13 %) e a maior a 100°C (89,41 %), indicando uma possível relação com o aumento da temperatura. Esses valores, estão de acordo com o estudo realizado por Gamli *et al.* (2018), que avaliou em folhas de oliveira secas em micro-ondas com tensões de 90 e 167 watts e as infusões dessas folhas feitas na temperatura de 100°C, como sendo os maiores valores obtidos no estudo. Além disso, de acordo com Papageorgiou (2018), cuja obtenção dos extratos de folha de oliveira foi realizada com diferentes cultivares de oliveira, a percentagem de inibição do radical DPPH foi dividida entre as variedades de plantas, tendo valores próximos aos obtidos no presente estudo, variando de 89 a 92%.

Tabela 10: Valores médios do efeito bloqueador dos radicais de DPPH

	DPPH (% Inibição)			Valor de p
	P1	P2	P3	
60°C	86,77±0,97 ^{aA}	88,13±1,25 ^{bAB}	89,01±0,34 ^{bA}	***
70°C	86,73± 1,37 ^{aAB}	88,72±0,40 ^{bA}	88,74±0,39 ^{bA}	***
80°C	87,34±0,84 ^{aAB}	88,78±0,78 ^{bAB}	88,83±0,43 ^{bA}	***
90°C	88,16±0,67 ^{aB}	89,16±0,37 ^{bAB}	89,01±0,35 ^{bA}	***
100°C	86,94±0,54 ^{aA}	89,41±0,48 ^{cB}	88,72±0,62 ^{bA}	***
Valor de p	*	**	NS	

P1- infusão com 1g de folha; P2- infusão com 2g de folhas; P3- infusão com 3g de folhas

As médias com letras diferentes e maiúscula indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

As médias com letras diferentes e minúscula indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

NS Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e não foram verificadas diferenças com efeito significativo ($p > 0,05$).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($0,01 < p < 0,05$) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,01$) foi aplicado o teste de Games-Howell.

***Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,001$) foi aplicado o teste de Games-Howell

Para a infusão preparada com 3 gramas de folhas não foi verificada diferença estatística entre as temperaturas utilizadas, ou seja, tanto a 60°C quanto a 100°C a percentagem de inibição foi considerada igual, isso pode indicar que a utilização dessa concentração fica saturada em 200 mL de água, sendo menores concentrações mais recomendadas. Existem estudos sobre a atividade antioxidante das folhas de oliveira com comparativos em relação aos diferentes tipos de extração e também das diferentes cultivares existentes (Gamli *et al.*, 2018; Orak *et al.*, 2012; Žuntar *et al.*, 2019), os quais demonstram a alta capacidade antioxidante das folhas e que as quantidades de compostos fenólicos variam de acordo com a cultivar, com o método de extração e até mesmo a temperatura utilizada para a obtenção do extrato.

Na comparação, entre as concentrações utilizadas em cada temperatura, foi observada diferença estatística ($p < 0,001$) em todas. À temperatura de 80°C, ocorreu um ligeiro aumento da percentagem de inibição com o aumento da concentração de folhas, sendo os valores 87,34%, 88,78% e 88,83% para as infusões de 1, 2 e 3g, respectivamente. E o mesmo, nas temperaturas de 60 e 70°C, com as menores percentagens para a infusão com 1g de folhas.

Na concentração utilizada para a realização das análises de DPPH, avaliou-se no geral que as diferenças entre as formas de preparação das infusões foram menores, e valores de percentagem de inibição de DPPH obtidos por Ferreira *et al.* (2007), foram aumentando de acordo com a elevação da concentração do extrato e foram obtidos valores de 87,1 a 100% em uma concentração maior do que a utilizada no estudo em questão, com isso os dados da tabela 10, estão de acordo com os valores de Bahloul *et al.* (2009) e Ferreira *et al.*, (2007), indicando que as folhas de oliveira da cv. Santulhana apresentam atividade antioxidante ainda maior.

Contudo, os resultados obtidos indicam que não possui uma relação diretamente proporcional em relação à concentração de folhas utilizadas e a temperatura para esse parâmetro, ou seja, não são diretamente proporcionais e que o uso de 1g ou 3g tem o mesmo efeito para o efeito bloqueador de DPPH.

4.3.3 Atividade sequestradora do radical (ABTS^{•+})

A avaliação da capacidade antioxidante através da formação dos radicais ABTS^{•+} que é induzida pela metmioglobina e pelo peróxido de hidrogénio, permite avaliar a atividade de compostos que tenham origem hidrofílica ou lipofílica (Kuskoski *et al.*, 2005). Na determinação da atividade antioxidante nas diferentes infusões, os resultados obtidos (Figura 3), mostram um aumento na percentagem de inibição de acordo com o aumento da temperatura utilizada para a preparação das infusões. Para a amostra preparada com 1g de folha de oliveira em 200 mL de água (figura 3 (A)), as estatísticas realizadas mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos. Entre todas as temperaturas estudadas, a temperatura de 60°C diferenciou-se estatisticamente das restantes,

obtendo o valor mais baixo de $39,11 \pm 3,53\%$ expressos em percentagem de inibição, o valor mais elevado para a mesma concentração foi na temperatura de 100°C , na qual a percentagem de inibição do radical $\text{ABTS}\cdot^+$ foi de $67,53 \pm 1,87\%$.

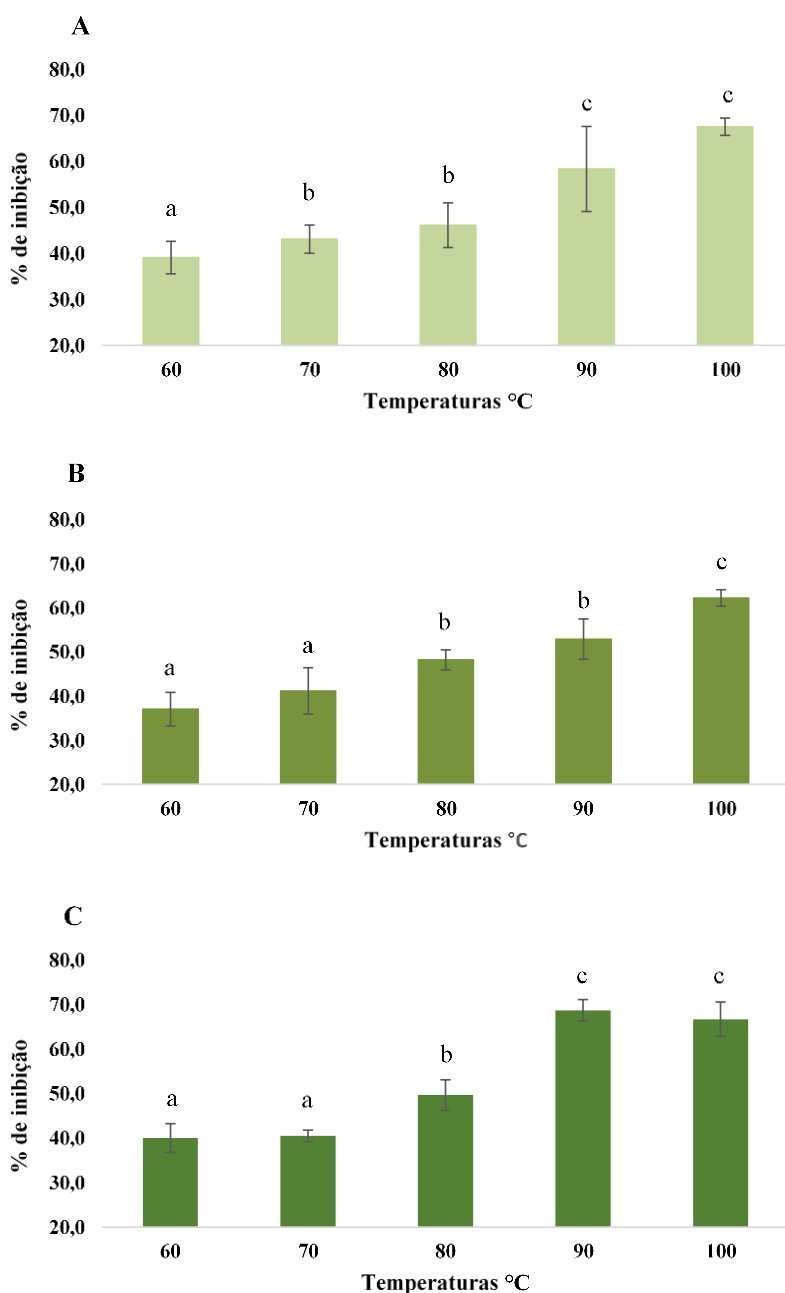


Figura 3: Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS das folhas de oliveira (A) Concentração 1g em 200 mL, (B) Concentração 2g em 200mL, (C) Concentração 3g em 200mL. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) (média \pm dp).

Para a concentração de 2 gramas de folha em 200 mL de água (figura 3 (B)) o valor mais baixo é compatível com a concentração anterior, tendo na temperatura de 60°C ($37,03 \pm 3,81\%$) de inibição, aos 100°C a resposta foi de $62,23 \pm 1,87\%$. Como esperado e de acordo com o que foi obtido, a concentração mais alta de 3g de folhas (figura 3 (C)) comportou-se de forma semelhante as demais, tendo como menor valor $40,01 \pm 3,21\%$ de inibição na temperatura de 60°C , nesse caso, os maiores

valores obtidos foram a 90°C e 100°C, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nessas temperaturas.

Comparando os resultados da análise de ABTS•⁺, observa-se que as infusões com diferentes concentrações e temperaturas apresentaram um comportamento semelhante, com a tendência de elevar a atividade sequestradora do radical ABTS•⁺ de acordo com o aumento de temperatura, tendo observado um leve desvio em apenas uma das amostras que obteve maior valor na temperatura de 90°C. Gião *et al.* (2007) realizou um estudo para avaliar como o modo de preparação interfere na capacidade antioxidante das infusões, para a folha de oliveira utilizou uma mistura de folhas e para o parâmetro da capacidade sequestradora dos radicais ABTS•⁺ o maior valor foi para a folha em pó preparada através do método de infusão $0,275 \pm 0,098 \text{ g L}^{-1}$ equivalente de ácido ascórbico, ou seja, o resultado é compatível com o estudo em questão, uma vez que o maior valor obtido também foi na temperatura de 100°C.

Os resultados obtidos nessa análise das infusões de folha de oliveira, mostraram que o comportamento das infusões em relação as diferentes concentrações apresentaram uma correlação com as temperaturas utilizadas no preparo das amostras, tendo a capacidade antioxidante aumentada com a elevação da temperatura, o que está conforme o exposto por Xie *et al.* (2015), cujo os resultados foram semelhantes apresentando o mesmo comportamento em relação a elevação da temperatura para a capacidade sequestradora do radical ABTS dos extratos de folhas de oliveira, obtendo valores de aproximadamente 80% de inibição.

4.3.4. Determinação do poder redutor

A avaliação do poder redutor é realizada, pois a mesma reflete na tendência de doar elétrons dos compostos bioativos presentes nos extratos, associando essa habilidade com a sua atividade antioxidante (Salah *et al.*, 2012), sendo assim a capacidade redutora de um determinado composto pode sugerir o quão alto é o seu poder antioxidante (Nashwa *et al.*, 2014).

É uma análise baseada no facto das principais substâncias presentes na solução e que tenha capacidade redutora reajam com o ferricianeto de potássio (Fe^{3+}) e formem o ferrocianeto de potássio (Fe^{2+}), com isso o composto formado reage com o cloreto férrico para formar o complexo férrico-ferroso que possui uma máximo de absorção a 700 nm (Bhalodia *et al.*, 2013). Essa reação de redução que ocorre é utilizada como indicadora da ação de doação de elétrons, isso porque é um mecanismo essencial na ação dos compostos fenólicos (Xie *et al.*, 2015).

Na tabela 11, podemos observar os resultados obtidos para esta análise. Os resultados de poder redutor variaram de $20,16 \pm 3,3$ a $89,15 \pm 2,09 \text{ mg trolox g extrato}^{-1}$, sendo a menor para a infusão com 1g de folhas a 60°C e a maior para a infusão com 3g e a 100°C. Na temperatura de 100°C, quando faz-se a comparação entre as concentrações houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre

os valores do poder redutor, sendo os dados obtidos para as concentrações de 1,2 e 3 gramas de folhas em 200 mL de água 81,4±4,65, 83,9±9,99, 89,15±2,09 mg de trolox g de extrato⁻¹, respectivamente.

De maneira geral, na interpretação dos resultados, o aumento da absorvância da solução designa que há aumento do poder redutor. Em compostos de origem natural, a atividade antioxidante tende a se correlacionar com o poder redutor devido à sua capacidade de doar hidrogénios (Xie *et al.*, 2015). Em relação ao poder redutor das infusões estudadas, foi observado que a temperatura influencia na atividade antioxidante relativamente a esse parâmetro (Tabela 11). É notório que o aumento da temperatura eleva os valores médios do poder redutor das infusões, indicando uma possível relação.

Na menor concentração utilizada, ocorreu um aumento de 20,16±3,3 a 81,4±4,65 mg de trolox g de extrato⁻¹ para as temperaturas de 60°C e 100°C, o mesmo ocorreu para a amostra com 3g de folhas variando de 24,01±1,91 a 89,15±2,09 mg de trolox g de extrato⁻¹.

Tabela 11: Valores médios do poder redutor das infusões de folha de oliveira

Poder redutor (mg Trolox g extrato⁻¹)				
	P1	P2	P3	Valor de p
60°C	20,16±3,3 ^{aA}	61,96±6,08 ^{bB}	24,01±1,91 ^{aA}	***
70°C	65,46±2,8 ^{cA}	31,23±4,66 ^{bA}	25,97±3,08 ^{aA}	***
80°C	58,16±27,53 ^{aBC}	54,56±6,9 ^{aB}	44,36±9,86 ^{aB}	NS
90°C	80,87±10,78 ^{bC}	59,63±8,13 ^{aB}	88,91±6,39 ^{bC}	***
100°C	81,4±4,65 ^{aC}	83,9±9,99 ^{abC}	89,15±2,09 ^{bC}	***
Valor de p	***	***	***	

P1- infusão com 1g de folha; **P2**- infusão com 2g de folhas; **P3**- infusão com 3g de folhas

As médias com letras diferentes e maiúscula indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si (p<0,05)

As médias com letras diferentes e minúscula indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si (p<0,05)

NS Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e não foram verificadas diferenças com efeito significativo (p>0,05).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (0,01<p<0,05) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,01) foi aplicado o teste de Games-Howell.

***Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,001) foi aplicado o teste de Games-Howell

Observou-se um aumento nos valores da absorvância que foram lidos a 700nm em relação ao aumento da temperatura, porém não foi verificado um aumento constante. Os resultados expressos em miligrama de trolox por grama de extrato (Tabela 11) demonstraram que há diferenças significativas (p <0,001) na comparação entre as concentrações e temperaturas utilizadas.

Os presentes resultados mostraram que com o aumento da temperatura, a atividade antioxidante nas infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana com relação ao poder redutor também

aumentou, apresentando uma correlação entre esses parâmetros, ou seja, o preparo das amostras com altas temperaturas como a de 90 e 100°C contribui para a elevação do poder redutor nas infusões.

4.3.4 Diferentes grupos fenólicos

Para as infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana realizou-se o estudo da sua composição fitoquímica, designadamente em relação aos teores de compostos fenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) e flavonóis, estando os dados obtidos apresentados nas figuras 4, 5 e 6. Os resultados obtidos mostram que para as infusões com 1g de folhas (figura 4), nas temperaturas de 70 e 80°C ($153,28 \pm 4,10$ e $152,33 \pm 8,04$ mg GAE g extrato⁻¹) respectivamente, foram considerados iguais entre si e diferentes nas temperaturas de 90 e 100°C que apresentaram valores de $165,98 \pm 7,34$ e $164,64 \pm 3,74$ mg GAE g extrato⁻¹.

Para o teor em fenóis totais, foi observado que as médias mais altas estão concentradas nas temperaturas de 90 e 100°C. Além disso, as figuras 4 e 5 mostram que não foi apresentada diferença estatística ($p < 0,001$) entre as temperaturas de 60 e 100°C, ou seja, para essas concentrações o preparo das infusões em alta ou baixa temperatura não interfere significativamente no teor de fenóis totais.

Para a amostra com 3g (figura 6) ocorreu diferença a um nível de 5% de significância nas temperaturas citadas anteriormente, sendo os valores obtidos de $140,93 \pm 2,95$ e $155,49 \pm 8,86$ mg GAE g extrato⁻¹, respectivamente. Sendo assim, com uma concentração maior de folhas nas infusões, a temperatura afeta no teor de fenóis totais extraídos.

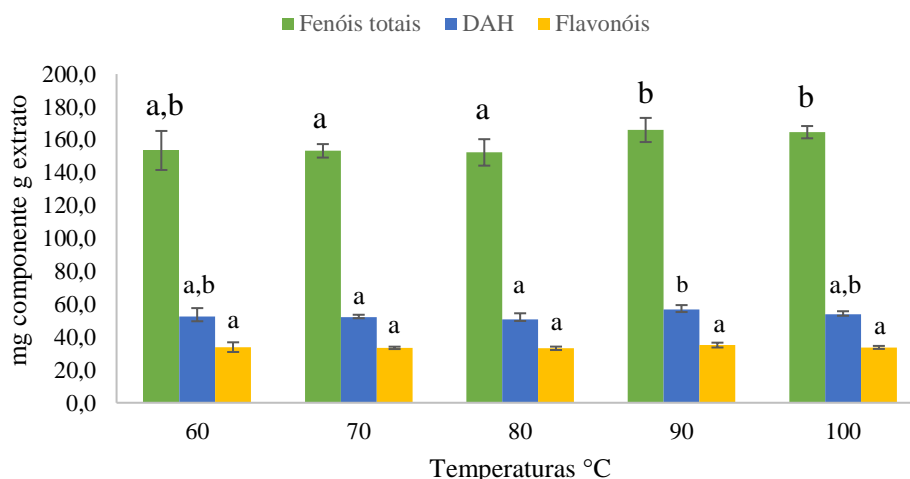


Figura 4: Composição das infusões com 1g de folhas de oliveira cv. Santulhana em fenóis totais (mg GAE extrato⁻¹), flavonóis (mg QE g extrato⁻¹) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg CAE g extrato⁻¹). Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($p < 0,05$) (média ± dp).

Na análise feita a 320 nm para quantificação dos derivados hidroxicinâmicos, que são compostos aromáticos que aparecem no formato de glucósidos ou em combinações do tipo éster (Ghanbari et al., 2012), os resultados foram considerados estatisticamente iguais para as concentrações de 1 e 2g (figuras 4 e 5) mesmo com temperaturas de extração sendo diferentes, ou

seja, para esses compostos a temperatura não interfere na quantidade de derivados hidroxicinâmicos extraídos durante a infusão.

Novamente, para a maior concentração estudada, observou-se diferença estatística entre as temperaturas de 60 e 100°C, $31,45 \pm 0,89$ mg CAE g extrato⁻¹ e $34,87 \pm 2,35$ mg CAE g extrato⁻¹, salientando que a temperatura utilizada no preparo da infusão implica na variação na quantidade extraída desses compostos.

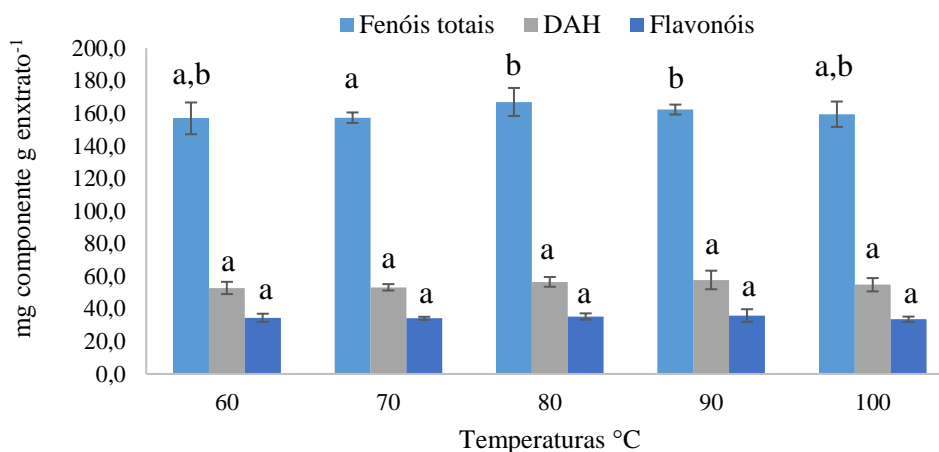


Figura 5: Composição das infusões com 2g de folhas de oliveira cv. Santulhana em fenóis totais (mg GAE extrato⁻¹), flavonóis (mg QE g extrato⁻¹) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg CAE g extrato⁻¹). Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($p < 0,05$) (média \pm dp).

Para o terceiro grupo de compostos analisados, os flavonóis, expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato, os resultados estão de acordo com o que foi discutido anteriormente, sem diferenças entre as temperaturas nas concentrações de 1 e 2g. Na figura 6, os resultados obtidos são referentes à concentração de 3g de folhas. Verificou-se que houve diferenças estatisticamente significativas nos valores obtidos nas mesmas temperaturas citadas para as outras substâncias, a 60°C o valor médio foi de $48,15 \pm 1,11$ e $57,40 \pm 3,99$ mg QE g extrato⁻¹ a 100°C.

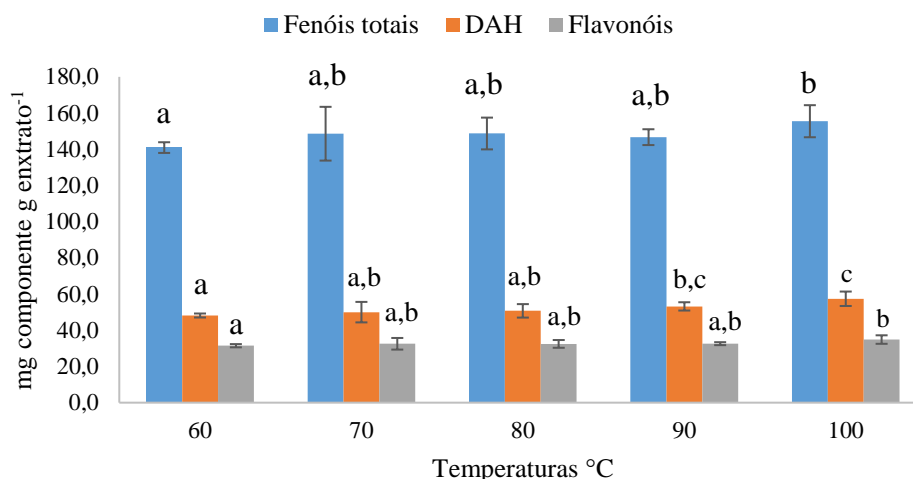


Figura 6: Composição das infusões com 3g de folhas de oliveira cv. Santulhana em fenóis totais (mg GAE extrato⁻¹), flavonóis (mg QE g extrato⁻¹) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) (mg CAE g extrato⁻¹). Dentro de cada componente estudado, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($p < 0,05$) (média \pm dp).

Putnik *et al.* (2017), realizou pesquisas para a obtenção de extratos ricos em polifenóis, sendo um desses parâmetros a avaliação da quantidade de ácido hidroxicinâmico e flavonóis. Os valores médios para a concentração de ácido hidroxicinâmico e flavonóis foram de 1.66 ± 0.01 e 8.66 ± 0.05 mg QE g extrato⁻¹, que são inferiores aos obtidos no presente trabalho, mostrando que as infusões da cv. Santulhana são promissoras ao nível de alta atividade antioxidante. Ademais, os valores mais elevados do ácido hidroxicinâmico foram observados em temperaturas próximas a 100°C, um fator consistente com o mostrado nas figuras 4, 5 e 6, apesar da proximidade dos valores obtidos entre as temperaturas determinadas para o preparo das infusões.

Analogamente ao que foi estudado por Lima *et al.* (2017), em que foi avaliada a atividade antioxidante de folhas de videira, em que na análise dos diferentes grupos fenólicos foram obtidos valores nos quais os teores de fenóis totais foram inferiores aos reportados pelo estudo em questão, seguido dos derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis.

No geral, com a avaliação dos diferentes grupos fenólicos foi percebido que o aumento da concentração de folhas faz com que a temperatura interfira na quantidade de compostos extraídos na infusão. E como os valores obtidos para cada item analisado, fenóis totais, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóis, estão próximos e só ocorre variação na maior concentração, o uso de 1g de folhas se mostra eficiente na obtenção de compostos que elevam a atividade antioxidante da infusão.

4.4. Caracterização sensorial, fração volátil e taninos hidrolisáveis de infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana

4.4.1. Análise sensorial

Em relação aos resultados da análise sensorial obtidos na prova das infusões de folha de oliveira, foram verificadas diferenças significativas em alguns dos parâmetros analisados. Avaliou-se o aspecto visual, aroma e paladar, além disso, utilizou-se a roda dos aromas para auxiliar na percepção sensorial de alguns elementos.

No aspecto visual das infusões, o painel avaliou a coloração, para as infusões com 1g e 2g de folhas, definiu-se que a coloração para todas as temperaturas, foi o bege claro nas temperaturas de 60, 70 e 80°C e coloração amarelo claro nas temperaturas de 90 e 100°C. Nas infusões com 3g de folhas, em todas as temperaturas a cor observada nas infusões foi amarelo claro. Sendo assim, notou-se que o aumento da quantidade de folhas, altera a coloração percebida visualmente pelos consumidores, e que a temperatura, nesse caso, não influenciou na cor observada das infusões.

Verificou-se que na intensidade de cor, para as amostras com 1g e 2g houve influência das temperaturas, apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,01$), sendo que a pontuação dada pelos provadores na temperatura de 60°C variou de 0,65 e 1,70 e na temperatura de 100°C verificou-se uma variação de 1,70 e 3,30, respectivamente, numa escala de 0 a 10. Diferentemente, para as infusões com 3g de folhas, não foi percebida diferença estatística significativa ($p > 0,05$) para as temperaturas empregadas no preparo das infusões, indicando que com o aumento da concentração, a temperatura não influencia na intensidade da coloração.

Relativamente à turbidez, as temperaturas não influenciaram nesse parâmetro, não foi identificada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) em todas proporções de folhas utilizadas. Porém, comparativamente entre as concentrações, a turbidez para as infusões com 3g de folhas apresentaram pontuações mais elevadas que as demais concentrações, indicando que o uso dessa quantidade de folhas aumenta a turbidez das infusões, entretanto é um parâmetro que não se destaca.

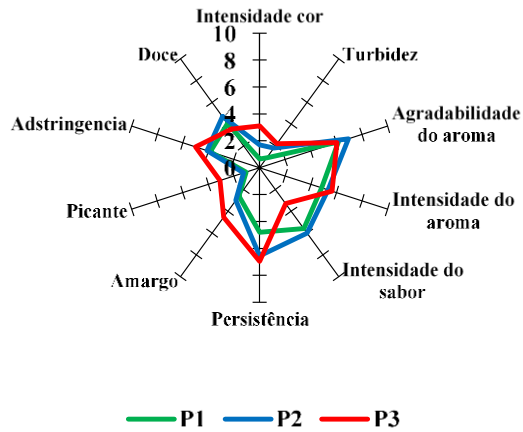
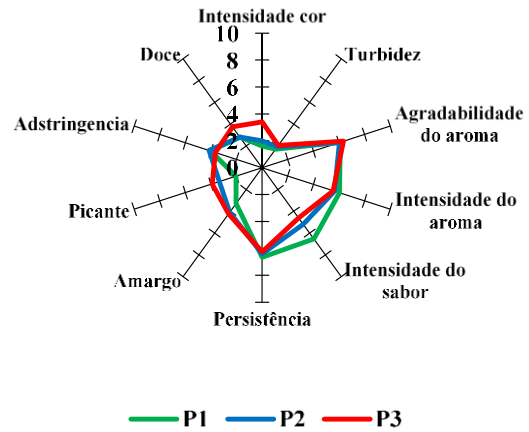
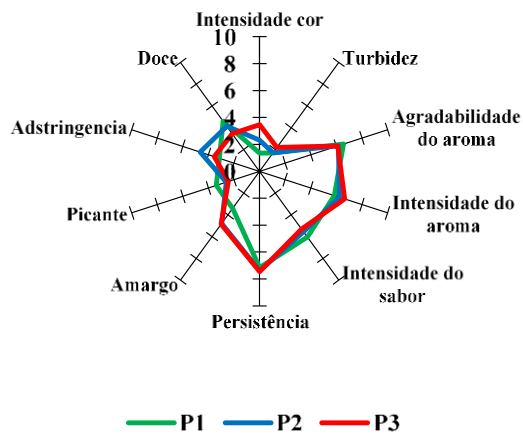
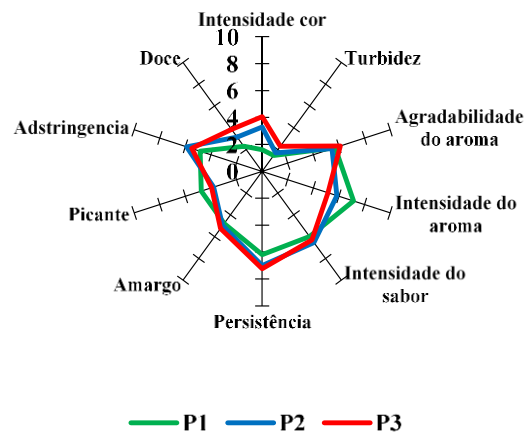
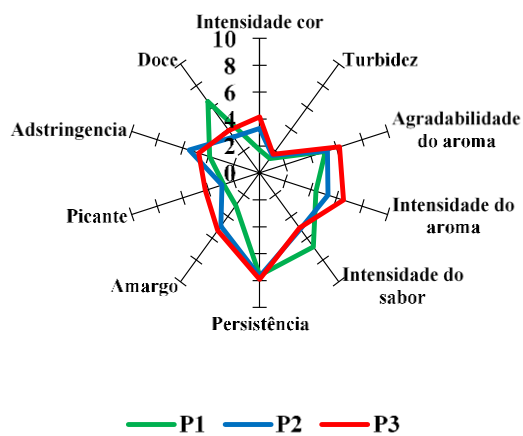
A**B****C****D****E**

Figura 7: Resultados obtidos para os parâmetros avaliados nas diferentes infusões de folha de oliveira cv. Santulhana pelo painel sensorial treinado. (A) Infusão a 60°C; (B) Infusão a 70°C; (C) Infusão a 80°C; (D) Infusão a 90°C; (E) Infusão a 100°C. P1: 1g de folha; P2: 2g de folhas; P3: 3g de folhas.

A agradabilidade do aroma, um fator importante para os consumidores, apresentou pontuação variando de 5,15 a 6,95. Como exposto na figura 7 (A), na temperatura de 60°C a infusão com 2g de folhas se destaca, com pontuação de 6,95, sendo diferente estatisticamente ($p < 0,01$) das outras temperaturas, já a 100°C a infusão com 3g de folhas, se sobressaiu, sendo avaliada com a nota de 6,25, em contrapartida a infusão com 1g de folhas obteve menos destaque e recebeu a menor pontuação com 5,15.

No atributo persistência, o qual é definido como o tempo de sensação do sabor das infusões depois que ela não está mais na boca, a maior concentração utilizada para o preparo das infusões, 3g de folhas se destacou nas temperaturas de 60, 80, 90 e 100°C, como mostrado na figura 7, tendo como pontuação 6,95, 7,45, 7,25 e 7,90, respectivamente. Com isso, é notório que o aumento no teor de folhas nas infusões a sensação do sabor é mais longo, ou seja, permanece durante mais tempo na boca.

Na avaliação do amargor, um fator importante em relação à aceitação dos consumidores, verificou-se que este variou de 2,60 e 5,30, sendo a menor para a infusão com 1g de folhas a 60°C e a maior para a infusão com 3g de folhas a 100°C. Para tal, foi percebido que em mais um dos aspectos avaliados as infusões com 3g receberam pontuações mais altas comparativamente as demais concentrações, sendo 4,55, 4,25, 4,85, 5,25 e 5,30, para as temperaturas de 60, 70, 80, 90 e 100°C respectivamente, sendo observada diferença estatística ($p < 0,01$).

Na classificação da adstringência, a infusão com 1g a 80°C, apresentou a menor pontuação (3,15) atribuída pelo painel sensorial, e a maior nota (5,90) foi para infusão com 2g na temperatura de 90°C. Em relação ao doce, a figura 7 (E) mostra que a infusão com a doçura mais agradável (6,55) foi a com 1g de folhas a 100°C, ao contrário da infusão com 1g de folhas e a 90°C (2,30), que foi avaliada com a menor pontuação entre todas as infusões.

Além da ficha sensorial (anexo I), utilizou-se a roda dos aromas (anexo II) como referência de aromas possíveis de serem identificados nas infusões. Com isso, o painel sensorial identificou os aromas de palha, mentol, mel e cedro, tendo a caracterização exposta na figura 8.

A sensação de palha, classificada como vegetal e herbal, foi percebida com mais intensidade nas infusões com 3g de folhas, sendo as pontuações atribuídas pelo painel, de 6,00, 6,60, 7,25, 7,50 e 7,85 para as temperaturas de 60,70,80,90 e 100°C. Outra sensação, com a mesma classificação, o mentol, foi verificada em todas as infusões, sendo na temperatura de 100°C, com a pontuação de 4,85, 3,30 e 6,40, para as infusões com 1,2 e 3g, respectivamente. Porém, na infusão com 1g de folha a temperatura, na qual o mentol se sobressaiu, foi a 90°C.

Em relação ao doce, identificado nas infusões, o aroma relacionado a esse atributo foi o mel, tendo maior e menor intensidade nas infusões de 3g e 1g, respectivamente.

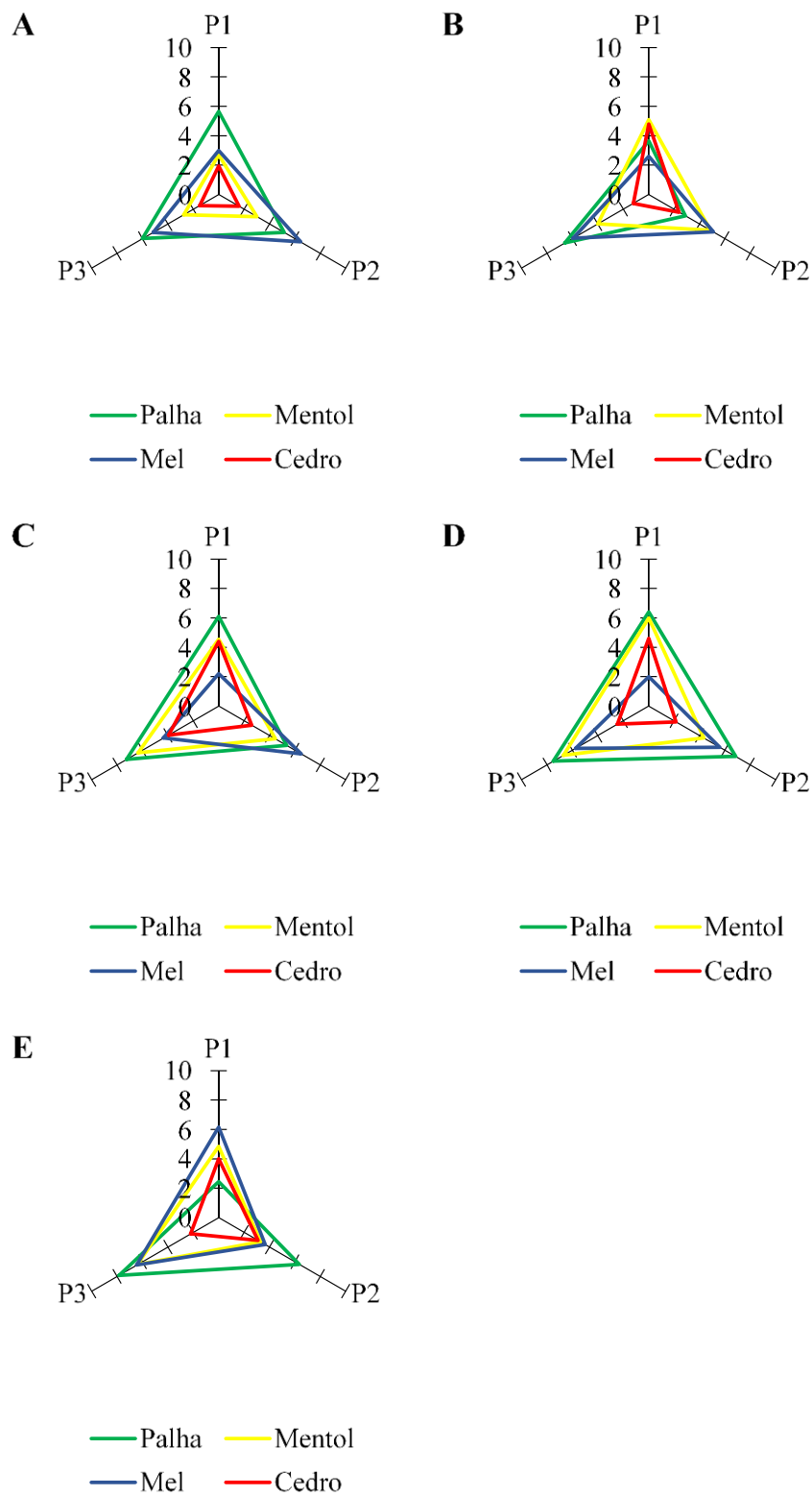


Figura 8: Resultados obtidos para os parâmetros avaliados com a roda de aroma nas diferentes infusões avaliadas pelo painel sensorial treinado. (A) Infusão a 60°C; (B) Infusão a 70°C; (C) Infusão a 80°C; (D) Infusão a 90°C; (E) Infusão a 100°C. P1: 1g de folha; P2: 2g de folhas; P3: 3g de folhas.

No geral, as pontuações variaram de 2 (menos intenso) a 6,50 (mais intenso), sendo o menor para a infusão a 90°C e com 1g de folhas, e a maior na temperatura de 80°C com 2g de folhas, valores que se correlacionam com a percepção da intensidade de doçura, apresentada na figura 7.

O cedro, classificado na roda dos aromas como vegetal e amadeirado, foi notado em todas as amostras provadas, sendo mais evidente nas amostras de infusões com 1g de folhas. A temperatura de 60°C apresentou as menores pontuações, sendo elas 1,95, 1,60 e 1,50, para as infusões com 1,2 e 3g de folhas, respectivamente.

4.4.2. Perfil de compostos voláteis

A fração volátil das infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana foi avaliada de acordo com as condições de preparo pré-estabelecidas, com variação na concentração e nas temperaturas das infusões. No geral, 11 voláteis foram identificados, sendo eles 1 álcool, 1 aldeído, 1 alcano, 3 ésteres, 1 hidrocarboneto aromático, 2 monoterpenos e 2 terpenos. Mudanças quantitativas foram observadas de acordo com a variação de concentração e temperatura das infusões. Os voláteis identificados são, nomeadamente, isoctano, etanoato de butilo, 2-metil-1-butil acetato, acetato de hexilo, m-cimeno, D-limoneno, eucaliptol, linalol, cânfora, hexanoato de butilo e decanal. Na figura 9, encontram-se representadas as fórmulas estruturais químicas destes compostos. As diferentes formas de preparo de infusões apresentaram uma composição similar entre elas.

Entre os compostos voláteis identificados e quantificados, os que se encontraram em maior quantidade foram o acetato de hexilo, etanoato de butilo, 2-metil-1-butil acetato, D-limoneno e isoctano, tal como o indicado na tabela 12. Pelo contrário, os compostos voláteis que se apresentaram em quantidades menores foram a cânfora, hexanoato de butilo e decanal. Resultados semelhantes, em relação aos compostos identificados, foram obtidos por Brahmi *et al.* (2011) e Malheiro *et al.* (2016). Em relação aos compostos voláteis expostos na tabela 12, o acetato de hexilo revelou ser o composto maioritário em todas as amostras de infusões, variando entre 14,26% e 30,13%. Notou-se que a 90°C houve uma diminuição da presença desse composto nas infusões, de acordo com a elevação da quantidade de folhas, resultando nos valores de 30,13%, 27,26% e 16,12%, com diferença estatística ($p < 0,01$) para as infusões com 1,2 e 3g, respectivamente. O acetato de hexilo foi identificado como composto volátil em folhas de oliveira por Malheiro *et al.* (2016), e além de ser identificado em folhas de oliveira, esse composto já foi notado em azeites, de acordo com Angerosa (2002) e Gonzalez *et al.* (2007), um composto produzido pela lipoxigenase e um marcador de qualidade do azeite.

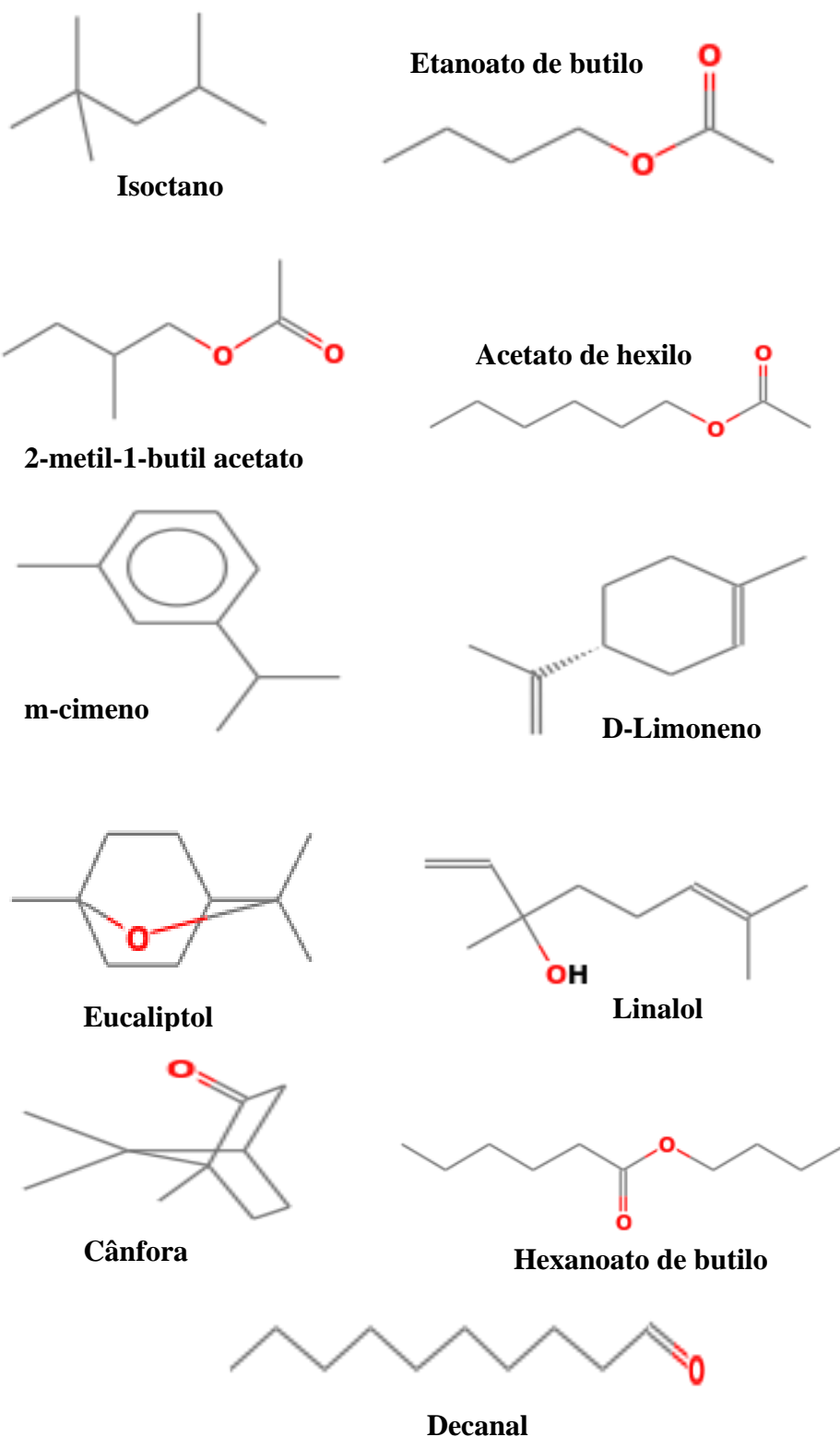


Figura 9: Estruturas químicas dos compostos voláteis identificados nas infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana.

O etanoato de butilo identificado nas infusões expressou-se em valores de 7,11% a 16,34%, sendo o menor para a infusão com 2g de folhas a 100°C e o maior para a mesma concentração a 70°C. As percentagens obtidas para esse composto volátil mostram que com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição da sua quantidade nas infusões. Para as infusões com 1g de folhas, foi relatado

que há diferença estatística ($p < 0,001$) entre as temperaturas de 60°C, com a percentagem de 15,95%, e a 100°C com 9,56%, o mesmo ocorreu com a infusão preparada com 2g de folhas, e os valores foram de 15,96% e 7,11% para as temperaturas de 60 e 100°C, respectivamente. Esse éster, encontrado em diversos tipos de frutas, foi identificado também em azeites virgem por Angerosa (2002) e Kalua *et al.* (2007), sendo um composto caracterizado sensorialmente como verde, frutado e picante por Morales *et al.* (2005).

O 2-metil-1-butil acetato, também conhecido como acetato de amila ativo, pertence à classe dos ésteres, sua presença variou de 5,32% a 11,90%, sendo o menor para a amostra de infusão com 3g de folhas a 60°C e a maior para a infusão com 2g de folhas a 60°C. De forma geral, com o aumento da temperatura a percentagem 2-metil-1-butil acetato presente nas infusões diminuiu, e a amostra com a maior concentração apresentou os menores valores, sendo eles 5,32 %, 7,90%, 9,59%, 5,95% e 6,94% para as temperaturas de 60, 70, 80, 90 e 100°C, respectivamente, apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,01$). Esse composto volátil também foi identificado por Luna *et al.* (2006) e García González *et al.* (2014), em azeites virgens, tendo como caracterização sensorial a sensação de frutado, verde e de banana.

Um outro composto identificado em maior quantidade foi o D-limoneno, um terpeno, que teve sua concentração variando entre as diferentes infusões. A infusão que apresentou a maior percentagem de D-limoneno foi a preparada com 2g de folhas e a 60°C contendo 11,61%. Foi observada uma correlação entre a concentração de folhas e a percentagem presente desse composto volátil, com o aumento da quantidade de folhas nas infusões e nas temperaturas de 60, 70, 90 e 100°C, ocorreu aumento na percentagem de D-limoneno. Além disso, as percentagens obtidas para as infusões com 3g de folhas, foram menores em relação às demais proporções, apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre as temperaturas utilizadas.

O isoctano, um alcano, foi identificado nas infusões da cv. Santulhana estudadas, porém não foi detectado em todas as amostras. Sua quantificação e identificação não foram obtidas para as temperaturas de 80°C e 90°C, com exceção para a infusão com 3g de folhas a 90°C, na qual a percentagem foi de 45,73%, um valor expressivo em comparação às demais infusões. Além disso, nessa mesma concentração, as percentagens desse composto a 60, 70 e 100°C, foram de 54,59%, 29,96% e 26,26%, respectivamente. Esse composto tem a necessidade de ser avaliado, mais precisamente, pois para as infusões da cv. Santulhana foi quantificado em quantidade significativa e ainda não há dados na literatura sobre a sua presença em infusões ou extratos de folha de oliveira.

Tabela 12: Valores médios das percentagens relativas dos principais compostos voláteis detetados em infusões de folhas de oliveira cv. Santulhana.

		Temperaturas					
Compostos		60°C	70°C	80°C	90°C	100°C	Valor de p
Isoctano	P1	11,01±0,44 ^{aA}	7,32±1,49 ^{aA}	n.d	n.d	20,08±2,75 ^{aB}	***
	P2	5,72±0,22 ^{aA}	5,24±0,94 ^{aA}	n.d	n.d	27,23±2,47 ^{aB}	***
	P3	54,59±10,99 ^{bB}	29,96±5,22 ^{bA}	n.d	45,73±9,02 ^{AB}	26,26±3,32 ^{aA}	**
		**	***			*	
Etanoato de butilo	P1	15,95±0,18 ^{bC}	15,60±0,99 ^{bC}	16,51±0,50 ^{bC}	12,69±0,57 ^{bB}	9,56±0,42 ^{aA}	***
	P2	15,96±0,63 ^{bC}	16,34±1,33 ^{bC}	14,27±2,06 ^{abBC}	11,54±1,07 ^{bB}	7,11±1,84 ^{abA}	***
	P3	7,48±1,54 ^{aAB}	10,50±0,99 ^{aBC}	12,38±1,36 ^{aC}	6,96±1,42 ^{aA}	8,14±0,40 ^{bAB}	**
		***	**	*	**	*	
2-metil-1-butil acetato	P1	11,66±0,50 ^{aB}	11,24±0,31 ^{bB}	11,56±0,93 ^{aB}	10,56±0,40 ^{bB}	8,24±0,80 ^{aA}	***
	P2	11,90±0,15 ^{aB}	10,81±0,73 ^{bB}	11,25±0,94 ^{aB}	10,22±0,21 ^{bB}	6,19±1,79 ^{aA}	***
	P3	5,32±1,19 ^{bA}	7,90±0,50 ^{aAB}	9,59±1,19 ^{aB}	5,95±1,41 ^{aA}	6,94±0,25 ^{aAB}	**
		***	**	NS	**	NS	
Acetato de hexilo	P1	21,02±4,11 ^{aAB}	22,65±1,54 ^{aA}	23,45±6,08 ^{aAB}	30,13±0,41 ^{bB}	23,28±1,68 ^{bA}	**
	P2	24,22±1,27 ^{aA}	22,38±2,55 ^{aA}	25,86±3,94 ^{aA}	27,26±3,76 ^{bA}	21,76±0,94 ^{abA}	NS
	P3	14,26±1,80 ^{bA}	18,63±2,84 ^{aAB}	25,39±1,07 ^{aB}	16,12±4,44 ^{aAB}	20,09±0,97 ^{aA}	**
		*	NS	NS	**	NS	
m-cimeno	P1	4,71±0,47 ^{cB}	2,59±0,95 ^{aA}	2,30±0,32 ^{bA}	3,65±0,31 ^{bA}	2,33±0,32 ^{aA}	**
	P2	2,70±0,78 ^{bA}	1,78±0,19 ^{aAB}	1,80±0,05 ^{aAB}	1,68±0,06 ^{aB}	1,63±0,11 ^{aB}	*
	P3	1,05±0,39 ^{aA}	1,58±0,31 ^{aAB}	1,55±0,11 ^{aAB}	1,32±0,13 ^{aA}	2,91±1,00 ^{aB}	*
		**	NS	**	***	NS	
D-Limoneno	P1	11,05±2,18 ^{bA}	10,75±1,21 ^{aA}	9,63±3,19 ^{aA}	11,41±0,83 ^{bA}	8,78±1,12 ^{aA}	NS
	P2	11,61±0,92 ^{bAB}	9,89±0,49 ^{aA}	10,63±1,96 ^{aAB}	9,96±2,27 ^{bAB}	7,83±0,16 ^{aB}	**
	P3	7,07±0,46 ^{aB}	9,27±0,00 ^{aC}	10,74±1,26 ^{aC}	4,19±0,87 ^{aA}	7,06±0,47 ^{aB}	***
		*	NS	NS	**	NS	
Eucaliptol	P1	7,99±0,16 ^{bB}	8,02±0,13 ^{bB}	8,52±1,52 ^{aAB}	8,14±0,30 ^{bB}	5,26±0,40 ^{aA}	**
	P2	7,68±0,12 ^{bA}	7,50±0,60 ^{bA}	7,52±0,42 ^{aA}	8,13±0,28 ^{bA}	4,39±1,26 ^{aB}	***
	P3	3,69±0,87 ^{aA}	5,49±0,50 ^{aB}	7,22±0,34 ^{aC}	3,77±0,78 ^{aA}	5,18±0,36 ^{aAB}	***
		***	**	NS	***	NS	
Linalol	P1	4,40±0,93 ^{bA}	5,38±0,76 ^{bA}	4,49±0,74 ^{aA}	3,92±0,33 ^{bA}	4,71±0,50 ^{aA}	NS
	P2	4,60±0,37 ^{bA}	4,63±0,44 ^{abA}	4,23±0,65 ^{aA}	4,69±0,87 ^{bA}	3,92±1,19 ^{aA}	NS
	P3	2,26±0,27 ^{aAB}	3,60±0,71 ^{aBC}	4,58±0,14 ^{aC}	1,38±0,00 ^{aA}	4,81±1,05 ^{aC}	***
		**	*	NS	***	NS	
Cânfora	P1	3,13±0,37 ^{bB}	3,15±0,29 ^{bB}	3,60±0,24 ^{bB}	2,21±0,09 ^{bA}	1,95±0,12 ^{aA}	***
	P2	2,74±0,17 ^{bAB}	2,87±0,28 ^{abB}	2,44±0,29 ^{aAB}	2,50±0,34 ^{bAB}	1,85±0,51 ^{aA}	*
	P3	1,39±0,18 ^{aAB}	2,13±0,31 ^{aBC}	2,50±0,15 ^{aC}	1,32±0,17 ^{aA}	2,41±0,49 ^{aC}	***
		***	*	**	***	NS	
Hexanoato de butilo	P1	1,13±0,07 ^{bA}	1,15±1,15 ^{aA}	1,41±0,03 ^{aA}	2,50±0,19 ^{bB}	2,73±0,36 ^{aB}	***
	P2	1,29±0,14 ^{bA}	1,16±0,16 ^{aA}	1,74±0,48 ^{abAB}	2,27±0,46 ^{abB}	2,54±0,10 ^{aB}	**
	P3	0,49±0,07 ^{aA}	1,24±0,03 ^{aB}	2,00±0,05 ^{bC}	1,49±0,23 ^{aB}	2,39±0,26 ^{aC}	***
		***	NS	**	*	NS	
Decanal	P1	0,07±0,00 ^{bA}	0,08±0,00 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,23±0,04 ^{bB}	0,18±0,01 ^{aB}	***
	P2	0,07±0,02 ^{bAB}	0,06±0,02 ^{aA}	0,14±0,02 ^{bBC}	0,21±0,02 ^{bC}	0,16±0,05 ^{aC}	**
	P3	0,03±0,00 ^{aA}	0,07±0,00 ^{aB}	0,22±0,02 ^{cD}	0,09±0,01 ^{aB}	0,18±0,01 ^{aC}	***
		**	NS	***	**	NS	
Valor de p		**	NS	***	**	NS	

P1- infusão com 1g de folha; P2- infusão com 2g de folhas; P3- infusão com 3g de folhas

As médias com letras diferentes e maiúscula indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si (p<0,05)

As médias com letras diferentes e minúscula indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si (p<0,05)

n.d Composto não detectado

NS Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e não foram verificadas diferenças com efeito significativo (p>0,05).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (0,01<p<0,05) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,01) foi aplicado o teste de Games-Howell.

***Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,001) foi aplicado o teste de Games-Howell

O eucaliptol, um composto orgânico também conhecido como 1,8-cineole, presente em muitos óleos essenciais de plantas, foi identificado em todas as amostras de infusões e com decréscimo na sua percentagem conforme a elevação da temperatura, variando de 3,69% a 8,52%. Na infusão com 1g de folha, a 60°C, a percentagem de eucaliptol detectada foi de 7,99% e para 100°C, 5,26%, apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre todas as temperaturas empregues na preparação. Este composto está presente não somente nas folhas de oliveira, mas também no aroma de azeites virgens (Angerosa, 2002). Esse composto volátil presente nas infusões pode ter contribuído para a caracterização sensorial, pois foi percebida a sensação de menta na roda dos aromas realizada pelo painel sensorial treinado.

Quanto aos compostos presentes em menores quantidades, a cânfora aparece em baixas percentagens, variando de 1,32% a 3,60%. Nas infusões com 1g de folhas, notou-se que o aumento da temperatura diminuiu ligeiramente a percentagem presente da cânfora nessa infusão, a 60°C o valor obtido foi de 3,13% e para 100°C foi de 1,95%, apresentando diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$). Na comparação entre as concentrações, a infusão com 3g de folhas apresentou valores mais baixos em relação às infusões com 1g de folhas, indicando que o aumento da concentração não aumenta a percentagem presente na infusão deste composto. Na temperatura de 100°C não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$), e os valores foram 1,95%, 1,85% e 2,41% nas infusões com 1,2 e 3g, respectivamente. A cânfora, também já foi identificada por Brahmi *et al.*, (2011) e Baccouri *et al.*, (2007) nos derivados da oliveira.

O linalol, composto identificado em todas as amostras, não apresentou correlação com as temperaturas testadas, as amostras com 1g e 2g, não apresentaram diferença estatística significativa em relação à temperatura, ou seja, considera-se que as quantidades detectadas em todas as temperaturas apresentaram similaridade. Já as amostras com 3g, apresentam diferenças estatísticas significativas, tendo um ligeiro aumento com a elevação da temperatura, a 60°C, a percentagem obtida foi de 2,26% e a 100°C de 4,81%. O linalol, é um monoterpeneo, que já foi identificado por Flamini *et al.*, (2003) em folhas de oliveira, além disso, é um composto que contribui sensorialmente, tendo características como, por exemplo, odor cítrico e sabor amadeirado.

Em geral, a contribuição total dos compostos voláteis identificados, em todas as amostras, oscilou entre 76,17 % e 97,63 %, correspondendo estes valores às infusões preparadas com 3g a 80°C e 60°C, respectivamente.

4.4.3. Taninos hidrolisáveis

Taninos são polifenóis solúveis em água e que são divididos em hidrolisáveis e não hidrolisáveis (condensados) (Altop, 2019). Os taninos hidrolisáveis são compostos derivados do ácido gálico (3,4,5-trihidroxil ácido benzoico), é um composto que tem ganho interesse

cientificamente principalmente no setor alimentício, uma vez que afeta a qualidade dos alimentos de maneiras diferentes, a principal forma conhecida é sua adstringência (Arapitsas, 2012). Podem ser classificados em duas classes, galotaninos e elagitaninos, sendo um a forma hidrostável e mais simples de um tanino, apresentando um resíduo polifenólico e um poliol e o outro o maior grupo de taninos isolados de produtos naturais, respectivamente (Chung et al., 1998). São compostos que fazem parte do grupo dos polifenóis e estão correlacionados com o consumo de hortaliças e frutas que trazem benefícios à saúde, como a diminuição do risco do cancro e doenças degenerativas, cujos estudos em relação à biodisponibilidade necessitam ser aprofundados (Araptistas, 2012).

Os taninos hidrolisáveis totais estão expressos em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de extrato e com os valores obtidos pelo estudo em questão (Tabela 13), é notável que na temperatura de 100°C a concentração de miligramas de ácido tânico por grama de extrato é mais elevada, os valores para as concentrações de 1, 2 e 3g são $120,66 \pm 13,53$ mg TAE g extrato⁻¹, $111,13 \pm 9,16$ mg TAE g extrato⁻¹ e $100,06 \pm 8,56$ mg TAE g extrato⁻¹, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2019), que estudou a estabilidade dos taninos hidrolisáveis da fruta *Trapa taiwanensis*. Em relação à estabilidade térmica em solução aquosa a 100°C durante um período de 4 horas, no início da análise a estabilidade a 100°C é bem elevada, indicando que o tempo de infusão das folhas de oliveira é ideal para a obtenção de valores satisfatórios de taninos hidrolisáveis.

A tabela 13 mostra que os dados obtidos não são muito homogêneos, mas pode-se concluir que as temperaturas mais elevadas aumentam o teor de taninos extraídos das folhas, ou seja, as infusões a 100°C podem apresentar um nível de adstringência maior do que as preparadas com temperaturas mais baixas. Porém, essa avaliação não pode ser considerada como regra, uma vez que os valores obtidos com as análises estão muito próximos. Para infusão com 3g de folhas, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$), entre as temperaturas, ou seja, a quantidade de taninos hidrolisáveis a 60°C e 100°C são iguais.

Tabela 13: Valores médios de taninos hidrolisáveis das infusões de folha de oliveira

Temperaturas	Taninos (mg TAE g extrato ⁻¹)			Valor de p
	P1	P2	P3	
60°C	105,7±11,52 ^{bAB}	92,19±5,04 ^{aA}	99,61±5,37 ^{abA}	**
70°C	96,07±6,82 ^{aA}	89,99 ±4,42 ^{aA}	99,61±5,37 ^{aA}	NS
80°C	93,08±13,5 ^{abA}	92,93±4,79 ^{aA}	100,21±3,99 ^{bA}	NS
90°C	114,37±7,73 ^{bB}	94,38±7,8 ^{aA}	95,48±5,85 ^{aA}	***
100°C	120,66±13,53 ^{bB}	111,13±9,16 ^{abB}	100,06±8,56 ^{aA}	*
Valor de p	***	***	NS	

P1- infusão com 1g de folha; P2- infusão com 2g de folhas; P3- infusão com 3g de folhas

As médias com letras diferentes e maiúscula indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

As médias com letras diferentes e minúscula indicadas em cada uma das linhas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

NS Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias e não foram verificadas diferenças com efeito significativo ($p > 0,05$).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($0,01 < p < 0,05$) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,01$) foi aplicado o teste de Games-Howell.

***Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo ($p < 0,001$) foi aplicado o teste de Games-Howell.

Variações do teor de taninos hidrolisáveis podem ser observadas quando a condição de extração dos compostos é alterada, para o preparo tradicional das infusões é necessário a utilização de água e temperatura. Banerjee et al. (2017) indica que o uso de água destilada como solvente resulta em um valor de taninos hidrolisáveis de 130.46 ± 1.48 mg equivalentes catequina g extrato seco⁻¹, um valor menor do que o obtido com extrações com metanol, porém é um valor referente a uma qualidade maior de extração de taninos hidrolisáveis.

Os resultados obtidos sugerem que é preciso uma avaliação mais profunda em relação à quantificação dos taninos hidrolisáveis em infusões, por ser um parâmetro que pode influenciar na qualidade sensorial, pois o fator adstringência é importante na preferência do consumidor pelo produto (Monteiro *et al.*, 2005). Apesar de serem iguais estatisticamente (Tabela 13), observa-se que a infusão preparada com 1g de folhas obteve os valores mais elevados em relação à quantificação de taninos hidrolisáveis, isso mostra que em mais uma das análises realizadas nas infusões a menor concentração designa-se com atividade antioxidante superior, levando a conclusão que o uso de 1g de folhas é o suficiente para a preparação da bebida, verificando-se a necessidade de se realizar estudos sobre os efeitos benéficos à saúde que a sua ingestão pode proporcionar.



Capítulo 5

Conclusão



5. Conclusão

No presente trabalho foi feito o estudo sobre a atividade antioxidante de infusões preparadas com folhas de oliveira da cv. Santulhana, uma vez que é uma variedade minoritária na região de Trás-os-Montes, com um elevado potencial para exploração. Concluiu-se com os resultados obtidos que ocorrem variações na composição fenólica das infusões, de acordo com a mudança nas formas de preparo.

Relativamente ao rendimento de extração das infusões, foi verificado que o uso de apenas 1g de folhas de oliveira é o suficiente para a obtenção de uma quantidade satisfatória de extrato. Uma vez que, as infusões de 2 e 3g foram consideradas saturadas, já que a percentagem de extração permaneceu estabilizada nas duas concentrações, com variações apenas de acordo com o aumento da temperatura de preparo. Sendo assim, para doses individuais de infusões, 1g de folhas é o suficiente para a obtenção de um rendimento de extração de liofilização considerável, e o aumento da quantidade de folhas não significou aumento no rendimento da extração.

Com a avaliação da composição fenólica das infusões, foi possível identificar e quantificar oito compostos fenólicos, nomeadamente, hidroxitirosol glicol, ácido clorogênico, ácido cafeico, verbascosídeo, oleuropeína, rutina, apigenina-7-*O*-glucósido e luteolina. Tendo a oleuropeína como composto maioritário, uma substância com capacidade antioxidante e que influenciou na sensorial das infusões, sendo o composto responsável pelo amargo identificado pelo painel sensorial. A capacidade redutora total foi desigual entre as formas de preparo utilizadas, e não foi estabelecida uma relação entre concentração e temperatura. Salientando, que os compostos fenólicos são afetados por fatores externos como as condições de preparo, o tipo de extração e o pré-tratamento aplicado na folha, o que possivelmente influenciou na capacidade redutora total das infusões.

Na avaliação da atividade antioxidante, verificou-se que o aumento da concentração de folhas e a elevação da temperatura potencializaram o poder redutor, ou seja, elevou a capacidade antioxidante das infusões. Já na determinação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, houve pouca variação de percentagem de inibição entre as amostras, tendo a infusão preparada com 1g de folhas os valores mais baixos, concluiu-se que o uso de maior quantidade de folhas para esse parâmetro eleva a seu poder antioxidante.

Para os diferentes grupos fenólicos analisados, concluiu-se que o teor em fenóis totais é influenciado pela variação de temperatura, os maiores valores obtidos foram a 100°C, indicando que a maior temperatura eleva a presença de compostos bioativos enriquecendo as infusões. O efeito sequestrante do radical ABTS e os taninos hidrolisáveis, no geral, foram mais elevados nas maiores temperaturas, indicando uma relação direta com a temperatura de extração. Para os taninos, não foi observada muitas variações nos valores obtidos entre os tratamentos aplicados nas infusões, e por

isso, é necessária uma avaliação mais aprofundada na quantificação de taninos hidrolisáveis, pois é um parâmetro importante na caracterização das infusões de folha de oliveira.

Para o perfil de compostos voláteis das infusões, foram identificados 11 compostos principais, sendo eles, isocatno, etanoato de butilo, 2-metil-1-butil acetato, acetato de hexilo, m-cimeno, D-limoneno, eucaliptol, linalol, cânfora, hexanoato de butilo e decanal. Esses compostos já foram identificados e quantificados na literatura, em folhas de oliveira, azeitonas e azeite, todos sendo derivados da oliveira.

Sensorialmente, verificou-se que as infusões com 3g de folhas destacaram-se em relação à intensidade dos atributos, tendo a maior pontuação na maioria dos parâmetros. Além disso, foi observada uma relação entre os compostos voláteis e a sensorial das infusões, uma vez que o eucaliptol detectado da análise de perfil volátil, está correlacionado com o mentol percebido na sensorial das infusões, e também o cedro, pode estar relacionado com o linalol identificado pela análise dos compostos voláteis, uma vez que apresenta característica de sabor amadeirado.

A realização desse trabalho permitiu concluir que, as infusões preparadas com folhas de oliveira da cv. Santulhana possuem alta capacidade antioxidante detectada através das análises realizadas. O estudo das diferentes concentrações de folhas, proporcionou a determinação de que 1g de folhas em granulometria reduzida é o suficiente para que os compostos fenólicos sejam extraídos em quantidades adequadas para uma dose individual de infusão.

Além disso, as temperaturas mais elevadas, de 80, 90 e 100°C, apresentaram maior eficiência na extração dos compostos, ou seja, como o preparo caseiro de costume é realizado a 100°C, a quantidade de polifenóis presentes nas infusões pode trazer benefícios para o consumidor. Para tal, apesar de já existirem estudos sobre o assunto, é preciso analisar com mais exatidão a relação entre a quantidade de compostos fenólicos extraídos e seus benefícios ao organismo.

Sendo assim, o presente trabalho possibilitou concluir que pelas propriedades sensoriais e a sua caracterização, as infusões de folha de oliveira da cv. Santulhana representam uma alternativa para o aproveitamento desse sub-produto da oliveira, além disso, determinou-se que a melhor combinação para otimizar a bioatividade das infusões, é utilizar 1g de folhas de oliveira da cv. Santulhana em temperaturas mais elevadas, sendo a de 100°C a sugerida pelo estudo.

Com isso, pode-se sugerir a valorização das folhas de oliveira dessa cultivar, muito presente na região de Trás-os-Montes, pois é um subproduto da oleicultura, sendo uma matéria-prima de baixo custo e elevado potencial para comercialização. A infusão é apenas uma das alternativas para utilização da folha de oliveira, que pode também ser utilizada para extração dos compostos fenólicos e utilização como antioxidantes de origem natural.

Para trabalhos futuros, sugere a realização de análises físico-química das folhas de oliveira da cv. Santulhana para uma caracterização mais completa, com mais conhecimento sobre sua

composição, com isso a valorização para sua utilização pode ser acrescida. Outra linha a seguir, seria a realização da curva de secagem das folhas de oliveira, avaliando seu tempo de secagem para ajustar modelos matemáticos utilizando diferentes temperaturas e modos de secagem.

Além disso, sugere-se efetuar ensaios para a sua aplicação em produtos suscetíveis à oxidação, na tentativa de enriquecê-los com os compostos extraídos na infusão e, conseqüentemente, prolongar sua vida de prateleira, essa vertente amplia o espectro de utilidades das folhas de oliveira, aumentando o interesse das indústrias alimentares em investir na área de obtenção de aditivos de origem natural.

6. Referências bibliográficas

- Abaza, L.; Taamalli, A.; Nsir, H. & Zarrouk, M. (2015). Olive tree (*Olea europaeae* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*, 4(4), 682-698.
- Afonso, S.M. (2014). Utilização de extratos de folhas de oliveira como agente antioxidante. Tese de Mestrado. Bragança, Instituto Politécnico de Bragança. 102 p.
- Ahmad-Qasem, M.H.; Barrajon-Catalán, E.; Micol, V.; Mulet, A. & García-Pérez, J.V. (2013). Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*, 50(1), 189-196.
- Al-Rimawi, F.; Tarawa, M.S. & Elama, C. (2017). Olive Leaf Extract as Natural Antioxidant Additive of Fresh Hamburger Stored at 4°C Running Title: Antioxidants from Olive Leaves in Hamburger. *American Journal of Food Science and Technology*, 5(4), 162-166. doi: 10.12691/ajfst-5-4-7
- Almeida, T.S.; Araújo, M.E.M.; Rodríguez, L.G.; Júlio, A.; Mendes, B.G.; Santos, R.M.B. & Simões, J.A.M. (2019). Influence of preparation procedures on the phenolic content, antioxidant and antidiabetic activities of green and black teas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000117695>
- Altıok, E.; Bayçın, D.; Bayraktar, O. & Ülkü, S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 342-348. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.022>
- Altop, A. (2019). Effect of Solid-State Fermentation on Main Nutritional Components, Some Minerals, Condensed Tannin and Phenolic Compounds of Olive Leaves. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7, 115. doi: 10.24925/turjaf.v7i1.115-119.2231
- Andrikopoulos, N.; Kaliora, A.; Assimopoulou, A. & Papageorgiou, V. (2002). Inhibitory Activity of Minor Polyphenolic and Nonpolyphenolic Constituents of Olive Oil Against In Vitro Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of Medicinal Food*, 5, 1-7. doi: 10.1089/109662002753723160
- Angelo, P.M. & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 66(1), 01-09. http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt&tlng=pt.
- Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European journal of lipid science and technology*, 104(9-10), 639-660.
- Arantes, R. (2008). Avaliação da acção do pó da folha de oliveira (D-lenolato) em indicadores fisiológicos do murganho. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 74 p.

- Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food chemistry*, 135(3), 1708-1717. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>
- Baccouri, B.; Temime, S.B.; Campeol, E.; Cioni, P.L.; Daoud, D. & Zarrouk, M. (2007). Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils from five new cultivars. *Food chemistry*, 102(3), 850-856. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.012>
- Bahloul, N.; Boudhrioua, N.; Kouhila, M. & Kechaou, N. (2009). Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (*Olea europaea* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2561-2567.
- Baker, I.A. (2014). Investigation on antimicrobial and antioxidant effect of olive leaf extract in Karadi sheep meat during storage. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(9), 46-49.
- Banerjee, S.; Kaushik, S. & Tomar, R.S. (2017). Effect of different solvents on antioxidant activity of leaf extracts of *Calotropis procera* and *Azadirachta indica*. 10, 268-272. doi: 10.22159/ajpcr.2017.v10i1.15145
- Barboza, L.M.V.; Freitas, R. & Waszczynskyj, N. (2003). Desenvolvimento de produtos e análise sensorial. *Brasil alimentos*, 18, 34-35.
- Bassi, P.; Kumar, V.; Kumar, S.; Kaur, S.; Gat, Y. & Majid, I. (2020). Importance and prior considerations for development and utilization of tea bags: A critical review. *Journal of Food Process Engineering*, 43(1), e13069. doi: 10.1111/jfpe.13069
- Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuño, A. & Del Rio, J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry*, 68(4), 457-462.
- Berker, K.I.; Güçlü, K.; Tor, İ. & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157-1165.
- Bernardes, N.R.; Pessanha, F.F. & Oliveira, D. (2010). Alimentos funcionais: Uma breve revisão. *Ciência e Cultura*, 6(2), 11-20.
- Bhagwat, S.; Haytowitz, D.B. & Holden, J.M. (2011). USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3. *US Department of Agriculture: Beltsville, MD, USA*, 159.
- Bhalodia, N.R.; Nariya, P.B.; Acharya, R.N. & Shukla, V.J. (2013). In vitro antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of *Cassia fistula* Linn. *Ayu*, 34(2), 209-214. doi: 10.4103/0974-8520.119684
- Bissaro, C.A. (2015). Estudo da adição de folhas de oliveira durante o processo de extração na composição química e perfil sensorial de azeite virgem Cv. Cobrançosa utilizando

- Metodologia de Superfície de Resposta. Tese de Mestrado. Bragança, Instituto Politécnico de Bragança. 87 p.
- Bock, M.; Derraik, J.G.B.; Brennan, C.M.; Biggs, J.B.; Morgan, P.E.; Hodgkinson, S.C.; Hofman, P.L. & Cutfield, W.S. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PloS one*, 8(3), e57622. doi: 10.1371/journal.pone.0057622
- Bock, M.; Derraik, J.G.B. & Cutfield, W.S. (2012). Polyphenols and Glucose Homeostasis in Humans. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(6), 808-815. doi: 10.1016/j.jand.2012.01.018
- Bouaziz, M. & Sayadi, S. (2005). Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *European journal of lipid science and technology*, 107(7-8), 497-504.
- Boulanouar, B.; Abdelaziz, G.; Aazza, S.; Gago, C. & Miguel, M.G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46, 85-96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.020>
- Brahmi, F.; Dabbou, S.; Flamini, G.; Edziri, H.; Mastouri, M. & Hammami, M. (2011). Fatty acid composition and biological activities of volatiles from fruits of two Tunisian olive cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(6), 1316-1322. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02616.x
- Brahmi, F.; Flamini, G.; Issaoui, M.; Dhibi, M.; Dabbou, S.; Mastouri, M. & Hammami, M. (2011). Chemical composition and biological activities of volatile fractions from three Tunisian cultivars of olive leaves. *Medicinal Chemistry Research*, 21. doi: 10.1007/s00044-011-9817-8
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Briante, R.; La Cara, F.; Febbraio, F.; Patumi, M. & Nucci, R. (2002). Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 109-119.
- Bueno, L.P. (2019). Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos compostos fenólicos presentes em cranberry (*vaccinium macrocarpon*) desidratada e em medicamento fitoterápico usado na prevenção de infecções do trato urinário. Trabalho de Conclusão de curso. Barra dos Garças, Universidade Federal de Mato Grosso. 61 p.
- Cagliari, A. (2017). Influência da secagem convectiva em leito fixo sobre as propriedades da folha de oliveira (*Olea europaea* L.). Tese de Mestrado Bagé, Universidade Federal do Pampa. 100 p.

- Cardoso, L. (2013). Avaliação sensorial em infusões de plantas aromáticas e medicinais - influência dos fatores de pós-colheita e processo de preparação.
- Castillo, J.J.; Alcaraz, M. & Benavente-García, O. (2010). Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract,- *Olives and olive oil in health and disease prevention* In Victor R. Preedy & R. R. Watson (Ed.). San Diego, Academic Press, p. 951-958.
- Celano, M.; Maggisano, V.; Lepore, S.M.; Russo, D. & Bulotta, S. (2019). Secoiridoids of olive and derivatives as potential coadjuvant drugs in cancer: A critical analysis of experimental studies. *Pharmacological Research*, 142, 77-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.01.045>
- Charoenprasert, S. & Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(29), 7081-7095.
- Chiou, A.; Salta, F.; Kalogeropoulos, N.; Mylona, A.; Ntalla, I. & Andrikopoulos, N. (2007). Retention and Distribution of Polyphenols after Pan-Frying of French Fries in Oils Enriched with Olive Leaf Extract. *Journal of food science*, 72, S574-584. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00493.x
- Chung, K.-T.; Wong, T.Y.; Wei, C.-I.; Huang, Y.-W. & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(6), 421-464.
- Conde, E.; Cara, C.; Moure, A.; Ruiz, E.; Castro, E. & Domínguez, H. (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food chemistry*, 114(3), 806-812. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.017>
- Connor, D.J. & Fereres, E. (2005). The Physiology of Adaptation and Yield Expression in Olive,- *Horticultural Reviews*, p. 155-229.
- Cook, N.C. & Samman, S. (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76. doi: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
- Coppa, C.F.S.C. (2016). Extração de oleuropeína de folhas de oliva com solvente hidroalcoólico e efeito dos extratos sobre a estabilidade oxidativa de óleos vegetais. Tese de Mestrado. Pirassununga, Universidade de São Paulo. 95 p.
- Coppa, C.F.S.C.; Rosim, R.E.; Oliveira, C.A.F.; Rodrigues, C.E.C. & Gonçalves, C.B. (2017). Extraction of oleuropein from olive leaves using a hydroalcoholic solvent. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20. doi: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.16916>.
- Coutinho, E.F.; Ribeiro, F.C. & Cappellaro, T.H. (2009). Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). *Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção (INFOTECA-E)*, 122.
- Couto, A.; Silva, N.; Cecília, M.; Pereira, S.; Vassimon, H. & Oliveira, A. (2015). Alimentos Contendo Ingredientes Funcionais em sua Formulação: Revisão de Artigos Publicados em Revistas Brasileiras. *Revista Conexão Ciência*, 22, 58-63. doi: 10.24862/ccov.11i2.429

- Difonzo, G.; Russo, A.; Trani, A.; Paradiso, V.; Ranieri, M.; Pasqualone, A.; Summo, C.; Tamma, G.; Silletti, R. & Caponio, F. (2017). Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. *Journal of Functional Foods*, 31, 63-70. doi: 10.1016/j.jff.2017.01.039
- Dominciano, L.C.C. (2015). Avaliação de oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados, para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfícies inertes. Tese de Doutorado. Pirassununga, Universidade de São Paulo. 96 p.
- Dornas, W.C.; Oliveira, T.T.; Dores, R.R.; Santos, A.F. & Nagem, T.J. (2009). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(3), 241-249.
- Efmoropoulou, E. & Rodis, P. (2004). Complexation of Oleuropein and trans-Cinnamic Acid with Cyclodextrins. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(4), 362-366. doi: 10.1023/B:CONC.0000048248.51418.12
- Elfalleh, W.; Hannachi, H.; Tlili, N.; Yahia, Y.; Nasri, N. & Ferchichi, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(32), 4724-4730. doi: 10.5897/JMPR11.995
- Felicio, A. (2006). Consumo de suplementos alimentares em Portugal. *Estudo de mercado. Centro de Estudos de Gestão do Instituto Superior de Economia e Gestão. Lisboa.*
- Ferrão, M.L.C. (2012). Percepção dos consumidores portugueses sobre os alimentos funcionais. Tese de Mestrado. Estoril, Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril. 89 p.
- Ferreira, C.F.S. (2016). Análise sensorial de infusões de ervas aromáticas- Determinação das condições ótimas de preparação de infusões. Tese de Mestrado. Porto, Universidade Católica Portuguesa. 85 p.
- Ferreira, I.C.F.R.; Barros, L.; Soares, M.E.; Bastos, M.L. & Pereira, J.A. (2007). Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food chemistry*, 103(1), 188-195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.006>
- Flamini, G.; Cioni, P. & Morelli, I. (2003). Volatiles from Leaves, Fruits, and Virgin Oil from *Olea europaea* Cv. Olivastra Seggianese from Italy †. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 1382-1386. doi: 10.1021/jf020854y
- Gamli, Ö. (2016). The health effects of oleuropein, one of the major phenolic compounds of olives, *Olea europaea* L. *Italian Journal of Food Science*, 28, 2016-2178. doi: 10.14674/1120-1770%2Fijfs.v208

- Gamlı, Ö.F.; Süfer, Ö. & Eker, T. (2018). Dehydration Kinetics and Infusion Attributes of Microwave Dried Olive Leaves. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(8), 963-970.
- García González, D.L.; Aparicio Ruiz, R. & Morales Millán, M.T. (2014). Chemical characterization of organic and non-organic virgin olive oils. *OCL-Oilseeds and fats, crops and lipids*, 21 (5), 12-.
- Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K.M.; Gilani, A.-H. & Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3291-3340.
- Ghomari, O.; Sounni, F.; Massaoudi, Y.; Ghanam, J.; Drissi Kaitouni, L.B.; Merzouki, M. & Benlemlih, M. (2019). Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnol Rep (Amst)*, 23, e00347. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00347
- Gião, M.S.; González-Sanjósé, M.L.; Rivero-Pérez, M.D.; Pereira, C.I.; Pintado, M.E. & Malcata, F.X. (2007). Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2638-2647.
- Gonzalez, D.; Tena, N. & Aparicio, R. (2007). Characterization of olive paste volatiles to predict the sensory quality of virgin olive oil. *European journal of lipid science and technology*, 109, 663-672. doi: 10.1002/ejlt.200700056
- González, E.; Gómez-Caravaca, A.M.; Giménez, B.; Cebrián, R.; Maqueda, M.; Martínez-Férez, A.; Segura-Carretero, A. & Robert, P. (2019). Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 279, 40-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.127>
- Gorzynik-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappello, F.; Kuban-Jankowska, A.; Marino Gammazza, A.; Knap, N.; Wozniak, M. & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 686.
- Goulas, V.; Exarchou, V.; Troganis, A.N.; Psomiadou, E.; Fotsis, T.; Briasoulis, E. & Gerothanassis, I.P. (2009). Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular nutrition & food research*, 53(5), 600-608.
- Gouveia, F. (2006). Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. *Inovação Uniemp*, 2, 32-37.
- Hashmi, M.A.; Khan, A.; Hanif, M.; Farooq, U. & Perveen, S. (2015). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

- Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T. & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 2090-2097.
- Hollman, P.C.; de Vries, J.H.; van Leeuwen, S.D.; Mengelers, M.J. & Katan, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1276-1282.
- ISO 4121:2003: Sensory analysis - Guidelines for the use of quantitative response scales
- ISO 13299:2016: Sensory analysis - Methodology - General guidance for establishing a sensory profile
- ISO 3103:2019 Tea - Preparation Of Liquor For Use In Sensory Tests
- Japón-Luján, R. & Luque de Castro, M.D. (2006). Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 185-191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.081>
- Jemai, H.; El Feki, A. & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 8798-8804.
- Jiménez, P.; García, P.; Bustamante, A.; Barriga, A. & Robert, P. (2017). Thermal stability of oils added with avocado (*Persea americana* cv. Hass) or olive (*Olea europaea* cv. Arbequina) leaf extracts during the French potatoes frying. *Food chemistry*, 221, 123-129.
- Kajdzanoska, M.; Petreska, J. & Stefova, M. (2011). Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5272-5278.
- Kalua, C.; Allen, M.; Bedgood Jr, D.; Bishop, A.; Prenzler, P.D. & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food chemistry*, 100(1), 273-286.
- Kamran, M.; Hamlin, A.S.; Scott, C.J. & Obied, H.K. (2015). Drying at high temperature for a short time maximizes the recovery of olive leaf biophenols. *Industrial Crops and Products*, 78, 29-38. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.031>
- Kontogianni, V.G. & Gerathanassis, I.P. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Natural product research*, 26(2), 186-189.
- Korukluoglu, M.; Sahan, Y. & Yigit, A. (2008). Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of food safety*, 28(1), 76-87.

- Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732.
- Kwak, N.-S. & Jukes, D.J. (2001). Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*, 12(2), 109-117. doi: [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00029-3](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00029-3)
- Leonardis, A.; Aretini, A.; Alfano, G.; Macciola, V. & Ranalli, G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, 226(4), 653-659. doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0574-3>
- Lima, A.F.; Bento, A.; Pereira, J.A.; Baraldi, I.J. & Malheiro, R. (2017). Avaliação do teor em compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de videira com vista ao seu aproveitamento para uso alimentar. *Revista de Ciências Agrárias*, 40, 171-180.
- Liu, Y.; Luo, L.; Liao, C.; Chen, L.; Wang, J. & Zeng, L. (2018). Effects of brewing conditions on the phytochemical composition, sensory qualities and antioxidant activity of green tea infusion: A study using response surface methodology. *Food chemistry*, 269, 24-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.130>
- Luna, G.; Morales, M.T. & Aparicio, R. (2006). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food chemistry*, 98(2), 243-252. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.069>
- Malheiro, R.; Casal, S.; Cunha, S.; Baptista, P. & Pereira, J. (2016). Identification of leaf volatiles from olive (*Olea europaea*) and their possible role in the ovipositional preferences of olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Phytochemistry*, 121, 11-19. doi: [10.1016/j.phytochem.2015.10.005](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.10.005)
- Malheiro, R.; Rodrigues, N.; Bissaro, C.; Leimann, F.; Casal, S.; Ramalhosa, E. & Pereira, J.A. (2017). Improvement of sensorial and volatile profiles of olive oil by addition of olive leaves. *European journal of lipid science and technology*, 119(11), 1700177.
- Malheiro, R.; Rodrigues, N.; Manzke, G.; Bento, A.; Pereira, J.A. & Casal, S. (2013). The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Industrial Crops and Products*, 44, 37-43.
- Malik, N.S.A. & Bradford, J.M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 274-278. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.016>

- Malik, N.S.A. & Bradford, J.M. (2008). Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of food, agriculture & environment*, 6(2), 8.
- Marković, A.K.; Torić, J.; Barbarić, M. & Jakobušić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(10), 2001. doi: 10.3390/molecules24102001
- Martínez, L.; Ros, G. & Nieto, G. (2018). Hydroxytyrosol: Health Benefits and Use as Functional Ingredient in Meat. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 5(1), 13. doi: 10.3390/medicines5010013
- Martiny, T.; Dotto, G.L.; Moraes, C.C. & da Rosa, G.S. (2018). Filmes biodegradáveis preparados com carragena e extrato de folha de oliveira. *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp*, 179-193.
- Matos, M.; Mateus, C.; Machado, D. & Baptista, F. (2014). *As oliviculturas nacionais: Uma nova realidade em Portugal. Olival Tradicional: Contextos, Realidade e Sustentabilidade*. (1 ed.). Rota do Guadiana: Serpa, Portugal
- Matos, N.I.E.C. (2015). Contributo para a caracterização do azeite extraído na área de influência do Lagar Cooperativo dos Olivicultores da Região de Izedá, Crl. Tese de Mestrado. Bragança, Instituto Politécnico de Bragança. 80 p.
- Medina, E.; Castro, A.D.; Romero, C. & Brenes, M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(14), 4954-4961.
- Medina, E.; Romero, C.; García, P. & Brenes, M. (2019). Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food & function*, 10(8), 4716-4724.
- Mello, L.D. & Pinheiro, M.F. (2012). Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. *Alimentos e Nutrição*, 23, 537-548.
- Mendes, P.A.F. (2012). Caracterização da fração fenólica e atividade biológica de azeitonas de mesa ao natural produzidas na região de Trás-os-Montes. Tese de Mestrado. Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. 97 p.
- Mert, C.; Barut, E. & Ipek, A. (2013). Quantitative Seasonal Changes in the Leaf Phenolic Content Related to the Alternate-Bearing Patterns of Olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 995-1006.
- Micol, V.; Caturla, N.; Pérez-Fons, L.; Más, V.; Pérez, L. & Estepa, A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral research*, 66(2-3), 129-136.

- Molan, A.L.; De, S. & Meagher, L. (2009). Antioxidant activity and polyphenol content of green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(6), 497-506.
- Monteiro, A.M. (1999). A oliveira. *Série Patrimônio Natural Transmontano. João Azevedo Editor. Mirandela.*
- Monteiro, C.A.; Cannon, G.; Levy, R.; Moubarac, J.C.; Jaime, P.; Martins, A.P.; Canella, D.; Louzada, M.; Camila, D.P.C. & Ricardo, G.C. (2016). O Sistema Alimentar. *World*, 7(1-3).
- Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.; Araújo, E.D.L. & Amorim, E.L.C. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 28, 892-896.
- Moraes, F. (2007). Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3. doi: 10.5216/ref.v3i2.2082
- Morales, M.T.; Luna, G. & Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food chemistry*, 91(2), 293-301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.011>
- Mossion, A.; Potin-Gautier, M.; Delerue, S.; Le Hécho, I. & Behra, P. (2008). Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions. *Food chemistry*, 106(4), 1467-1475. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.098>
- Nashwa, M.F. & Abdel-Aziz, M. (2014). Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20 (1), 46-53.
- Nehir El, S. & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev*, 67(11), 632-638. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x
- Oliveira, D.M. & Bastos, D.H.M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, 34(6), 1051-1056. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600023>
- Orak, H.H.; Isbilir, S.S. & Yagar, H. (2012). Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1065-1074.
- Özcan, M.M. & Matthäus, B. (2017). A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243(1), 89-99. doi: 10.1007/s00217-016-2726-9
- Pacetta, C.F. (2013). Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína. Tese de Mestrado. Pirassununga, Universidade de São Paulo. 84 p.
- Panche, A.N.; Diwan, A.D. & Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. doi: 10.1017/jns.2016.41

- Papageorgiou, M. (2018). Screening Olive Leaves from Unexploited Traditional Greek Cultivars for Their Phenolic Antioxidant Dynamic. *Foods*, 7, 197. doi: 10.3390/foods7120197
- Pereira, A.; Ferreira, I.; Marcelino, F.; Valentão, P.; Andrade, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A. & Pereira, J. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.
- Pereira, R.J. & Graças Cardoso, M. (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of biotechnology and biodiversity*, 3(4), 146-152.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042. doi: 10.1021/np9904509
- Pisoschi, A.M.; Pop, A.; Cimpeanu, C. & Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 36. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Prieto-Hontoria, P. (2016). Innovación y tendencias alimentarias. *Contribuciones Científicas Y Tecnológicas*, 41, 15-20.
- Putnik, P.; Barba, F.J.; Španić, I.; Zorić, Z.; Dragović-Uzelac, V. & Bursać Kovačević, D. (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food and Bioproducts Processing*, 106, 19-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.004>
- Rahmanian, N.; Jafari, S.M. & Wani, T.A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, 42(2), 150-172.
- Rapoport, H.F.; Fabbri, A. & Sebastiani, L. (2016). Olive biology,- *The olive tree genome* In E. Rugini, L. Baldoni, R. Muleo & L. Sebastiani (Ed.), Springer, p. 13-25.
- Ribeiro, L.M.G.A. (2015). Avaliação do comportamento de consumo de infusões: um estudo exploratório baseado na etnografia visual. Tese de Mestrado. Porto, Universidade do Porto. 140 p.
- Ribeiro, P.B.; Alves, R.C.; Moraes, C.C. & da Rosa, G.S. (2017). Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato da folha de oliveira para aplicação em biofilmes. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 8(2).
- Rockenbach, I.I.; Rodrigues, E.; Cataneo, C.; Gonzaga, L.V.; Lima, A.; Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2009). Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 19(3), 271-276.
- Romani, A.; Ieri, F.; Urciuoli, S.; Noce, A.; Marrone, G.; Nediani, C. & Bernini, R. (2019). Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of *olea europaea* L. *Nutrients*, 11(8). doi: 10.3390/nu11081776

- Romani, A.; Mulas, S. & Heimler, D. (2017). Polyphenols and secoiridoids in raw material (*Olea europaea* L. leaves) and commercial food supplements. *European Food Research and Technology*, 243(3), 429-435.
- Sabry, O. (2014). Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts. *Journal of Natural Sciences Research*, 4, 1-9.
- Şahin, S. & Bilgin, M. (2018). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1271-1279.
- Şahin, S.; Bilgin, M.; Sayım, E. & Güvenilir, B. (2017). Effects of natural antioxidants in the improvement of corn oil quality: olive leaf vs. lemon balm. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 374-380. doi: 10.1111/ijfs.13291
- Salah, M.B.; Abdelmelek, H. & Abderraba, M. (2012). Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal chemistry*, 2, 107-111. doi: 10.4172/2161-0444.1000124
- Salgado, J. (2016). *Alimentos funcionais* (1 ed.): Oficina de Textos, p. 256.
- Sánchez, C.S.; González, A.M.T.; Parrilla, M.C.G.; Granados, J.J.Q.; Serrana, H.L.G.D.L. & Martínez, M.C.L. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593(1), 103-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037>
- Senger, A.E.; Schwanke, C. & Gottlieb, M. (2010). Green tea (*Camellia sinensis*) and its functionals properties on transmissible chronic diseases *Scientia Medica*, 20, 292-300.
- Seraglio, S.K.T.; Schulz, M.; Nehring, P.; Della Betta, F.; Valese, A.C.; Daguer, H.; Gonzaga, L.V.; Fett, R. & Costa, A.C.O. (2018). Determinação de compostos fenólicos por LC-MS/MS e capacidade de antioxidantes de acerola em três estádios de maturação comestíveis. *Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos*, 4, 96-110.
- Shalaby, A.R.; Anwar, M.M. & Sallam, E.M. (2018). Improving quality and shelf-life of minced beef using irradiated olive leaf extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(11). doi: 10.1111/jfpp.13789
- Shikanga, E.A.; Combrinck, S. & Regnier, T. (2010). South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*, 76(3), 567-571. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.010>
- Silva, S.; Gomes, L.; Leitao, F.; Coelho, A. & Boas, L.V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 12(5), 385-395.

- Singh, I.; Mok, M.; Christensen, A.-M.; Turner, A.H. & Hawley, J.A. (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(2), 127-132. doi: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.09.001>
- Singh, V.; Verma, D.K. & Singh, G. (2014). Processing technology and health benefits of green tea. *Popular Kheti*, 2(1), 23-30.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soares, A.L.; Moutinho, A.; Velho, D.; Campos, R. & Teixeira, Â. (2014). Estudo Prev-Natura: estudo da prevalência do consumo de produtos naturais. *Revista ADSO*, 2(3).
- Sudjana, A.N.; D'Orazio, C.; Ryan, V.; Rasool, N.; Ng, J.; Islam, N.; Riley, T.V. & Hammer, K.A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461-463.
- Susalit, E.; Agus, N.; Effendi, I.; Tjandrawinata, R.R.; Nofiarny, D.; Perrinjaquet-Moccetti, T. & Verbruggen, M. (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4), 251-258.
- Talhaoui, N.; Taamalli, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Fernández-Gutiérrez, A. & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
- Teleszko, M. & Wojdyło, A. (2015). Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *Journal of Functional Foods*, 14, 736-746. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>
- THIE. (2019). Tea and Herbal Infusions Europe. Retrieved 20 de Novembro de 2019, from <http://www.thie-online.eu/herbal-infusions/herbal-materials/>
- Tombesi, A.; Tombesi, S.; Saavedra, M.; Fernandes-Escobar, F.; d'Andria, R.; Lavini, A. & Jardak, T. (2007). *Production techniques in olive growing* (1 ed.). Príncipe de Vergara: International olive council, p. 348.
- Tsimidou, M.Z. & Papoti, V.T. (2010). Chapter 39 - Bioactive Ingredients in Olive Leaves,- *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* In V. R. Preedy & R. R. Watson (Ed.). San Diego, Academic Press, p. 349-356.
- Visioli, F.; Poli, A. & Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65-75. doi: 10.1002/med.1028
- Vizzotto, M.; Krolow, A. & Weber, G. (2010). Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. *Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-SE)*, 16.

- Vogel, P.; Machado, I.K.; Garavaglia, J.; Zani, V.T.; de Souza, D. & Dal Bosco, S.M. (2015). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutrición hospitalaria*, 31(3), 1427-1433.
- Wang, C.-C.; Chen, H.-F.; Wu, J.-Y. & Chen, L.-G. (2019). Stability of Principal Hydrolysable Tannins from *Trapa taiwanensis* Hulls. *Molecules*, 24(2). doi: 10.3390/molecules24020365
- Wille, G.M.F.; Wille, S.A.C.; Koehler, H.S.; Freitas, R.J.S. & Haracemiv, S.M.C. (2004). Práticas de desenvolvimento de novos produtos alimentícios na indústria paranaense. *Revista da FAE*, 7(2).
- Xie, P.-j.; Huang, L.-x.; Zhang, C.-h. & Zhang, Y.-l. (2015). Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. *Journal of Functional Foods*, 16, 460-471. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.005>
- Yildirim, R.M.; Ozulku, G.; Toker, O.S.; Baslar, M.; Durak, M.Z. & Sagdic, O. (2017). Modeling of Bioactive Compound Content of Different Tea Bags: Effect of Steeping Temperature and Time. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12773. doi: 10.1111/jfpp.12773
- Zachara, A.; Gałkowska, D. & Juszcak, L. (2018). Contamination of Tea and Tea Infusion with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1), 45.
- Zarzuelo, A.; Duarte, J.; Jimenez, J.; Gonzalez, M. & Utrilla, M. (1991). Vasodilator effect of olive leaf. *Planta medica*, 57(05), 417-419.
- Zhang, H.; Jiang, Y.; Lv, Y.; Pan, J.; Duan, Y.; Huang, Y.; Zhu, Y.; Zhang, S. & Geng, K. (2017). Effect of water quality on the main components in Fuding white tea infusions. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1206-1211. doi: 10.1007/s13197-017-2571-2
- Zhang, Y.; Wen, M.; Zhou, P.; Tian, M.; Zhou, J. & Zhang, L. (2020). Analysis of chemical composition in Chinese olive leaf tea by UHPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS and GC–MS and its lipid-lowering effects on the obese mice induced by high-fat diet. *Food Research International*, 128, 108785. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108785>
- Žuntar, I.; Putnik, P.; Bursać Kovačević, D.; Nutrizio, M.; Šupljika, F.; Poljanec, A.; Dubrović, I.; Barba, F.J. & Režek Jambrak, A. (2019). Phenolic and Antioxidant Analysis of Olive Leaves Extracts (*Olea europaea* L.) Obtained by High Voltage Electrical Discharges (HVED). *Foods*, 8(7), 248.

ANEXO I

Anexo II: Ficha sensorial utilizada na avaliação sensorial das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana.



Análise Sensorial de Infusões

Nome: _____

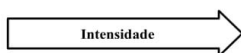
Código: _____ Data __/__/__ Hora: __: __

Descreva sucintamente as percepções dos parâmetros percebidos na infusão recebida:

Aspecto Visual:

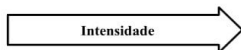
Coloração: _____

Intensidade de cor:



Clara _____ Escura

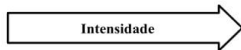
Turbidez:



Limpo _____ Turvo

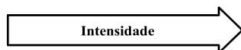
Aroma:

Agradabilidade do aroma:



Extremamente Desagradável _____ Extremamente Agradável

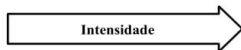
Intensidade de aroma:



Imperceptível _____ Extremamente Forte

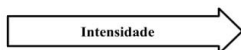
Paladar:

Intensidade do sabor:



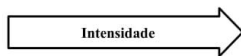
Extremamente Desagradável _____ Extremamente Agradável

Persistência:



Breve _____ Demorada

Amargo:



Nada Amargo



Extremamente Amargo

Picante:

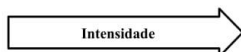


Nada Picante



Extremamente Amargo

Adstringência:



Nada Adstringente



Extremamente Picante

Doce:



Nada Doce



Extremamente Doce

Caracterização (roda dos aromas)

() _____

() _____

() _____

() _____

() _____

() _____

() _____

() _____

Boa prova!

ANEXO II

Anexo II: Roda dos aromas utilizada para auxílio na avaliação sensorial das infusões de folha de oliveira cv. Santulhana.

