

EXTRATOS FOLIARES DE *Olea europaea* L.: UMA ALTERNATIVA AOS ADITIVOS QUÍMICOS CONVENCIONAIS

T. R. MARTINY, B. Z. SILVA, P. B. RIBEIRO, C. C. MORAES e G. S. ROSA

Universidade Federal do Pampa, Programa de Pós Graduação em Engenharia
E-mail para contato: thamiris.martiny@hotmail.com

RESUMO – A utilização de extratos vegetais tende a ser uma alternativa aos aditivos químicos convencionais, sendo o extrato de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) uma opção com potencial uso como antimicrobiano. O objetivo deste trabalho foi a preparação de extratos de folhas de oliveira utilizando-se diferentes metodologias, a fim de se investigar a atividade antimicrobiana. Os extratos foram produzidos através de extração sólido-líquido por maceração, variando-se temperatura, agitação e tipo de filtração (filtração a vácuo com papel filtro, filtração simples com meios filtrantes de algodão hidrofílico, tecido e lã de vidro). A atividade antimicrobiana foi determinada por análises de inibição pelos extratos obtidos e foram feitas pelo método do cultivo em placas. A linhagem bacteriana utilizada nesse estudo foi *Escherichia coli* (ATCC 11229). Nas análises de inibição dos extratos, constatou-se que os extratos produzidos com menor tamanho de partícula das folhas processadas, obtidos após filtração com tecido, na menor temperatura e na maior agitação apresentaram o maior poder de inibição. Conclui-se que o extrato possui benefícios potenciais à aplicação como antimicrobiano, podendo ser incorporado na composição de embalagens para alimentos.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de produtos naturais ativos representa uma alternativa ao uso de aditivos químicos convencionais, como exemplo, aqueles utilizados para aumentar a vida de prateleira dos produtos alimentícios, os conservantes químicos (Maia, 2015; Ugalde, 2014).

Estudos recentes mostram a utilização de extratos de plantas para a redução de patógenos em alguns alimentos. Gutierrez (2008) estudou o efeito antimicrobiano de óleos essenciais, de origem vegetal, em alimentos e obteve como resultado, que a combinação de orégano com manjerona apresentou uma eficácia promissora contra *Escherichia coli* (*E. coli*).

Os compostos naturais podem ser capazes de inibir ou diminuir as reações de oxidação e o crescimento microbiano em alimentos, visando à manutenção de sua qualidade por um período maior de tempo (Del Ré; Jorge, 2012).

Neste contexto, o extrato bruto das folhas de oliveira (EBFO) é um dos extratos vegetais com potencial para essa aplicação. A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta frutífera, da família botânica *Oleaceae* (Coutinho *et al.*, 2009). As folhas dessa planta são consideradas um

subproduto gerado em grande quantidade na prática da olivicultura (Guinda *et al.*, 2004). Essas folhas já são usadas para fins medicinais, como o combate a febres, além disso, reconhecidamente possuem compostos com potencial antioxidante e antimicrobiano, porém o modo de ação do EBFO sobre patógenos transmitidos por alimentos ainda não está claro (Benavente-García *et al.*, 2000; Liu *et al.* (2017); Pacetta, 2013).

As folhas de oliveira possuem em sua composição um composto fenólico chamado oleuropeína, que possui propriedades antimicrobianas. Assim, os EBFO têm sido usados como medicamento natural e como uma alternativa de antimicrobiano (Pacetta, 2013; Mendes, 2012; Sudjana *et al.*, 2009).

Existem várias técnicas para a obtenção dos EBFO contendo oleuropeína, a extração pela maceração é uma das mais empregadas, esta realiza a dissolução dos compostos presentes na amostra sólida para o solvente extrator (Castro; Priego-Capote, 2010).

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a obtenção de extrato bruto de folhas de oliveira através de diferentes métodos de extração e a potencial atividade antimicrobiana dos extratos, a fim de uma possível aplicação como aditivos para alimentos.

2. METODOLOGIA

2.1. Material vegetal

As folhas de *Olea europaea* L., do cultivar Arbequina, foram coletadas em Junho de 2016, no município de Pinheiro Machado, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, cedidas pela estância Guarda Velha. As folhas foram higienizadas com água corrente, solução comercial de hipoclorito de sódio 2 % a 2,5 % e água destilada esterilizada. Posteriormente, foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C e cominuídas em moinho analítico. Foram ainda separadas frações com diferentes granulometrias através de peneiras fabricadas nos padrões ABNT/ASTM/TYLER. A Figura 1 ilustra as etapas do processamento das folhas.

Figura 1 – Etapas do processamento das folhas. (A) Folhas lavadas. (B) Folhas secas. (C) Folhas moídas e peneiradas.



Fonte: Elaborado pela autora.

2.2. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados por maceração dinâmica. Foram pesadas 5 g de cada amostra e adicionados 50 mL de água. A extração procedeu-se por um período de 24 h, sob agitação e temperaturas pré-determinadas e controladas. Decorrido o tempo de extração os

extratos foram filtrados com diferentes metodologias, a saber, filtração a vácuo (papel filtro), filtração simples com meios filtrantes de algodão hidrofílico, tecido de *nylon* e lã de vidro. Os extratos foram armazenados em frascos de vidro âmbar e acondicionados em refrigerador até execução das análises.

Elaborou-se um planejamento experimental do tipo fatorial completo com três repetições no ponto central a partir dos resultados obtidos nos testes anteriores, utilizando-se como variáveis independentes temperatura e rotação e como resposta a inibição proporcionada pelos extratos. Os resultados foram avaliados usando o *software Statistica 7.0*.

2.3. Ensaios de atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada por análises de inibição pelos extratos obtidos e foram feitas pelo método do cultivo em placas de Elisa adaptado em relação ao descrito na norma M7-A6 da NCCLS (2003). A linhagem bacteriana utilizada nesse estudo foi *E.coli* (ATCC 11229). A quantificação do efeito inibitório é feita por meio das diferenças de absorvância entre as duas leituras das amostras contendo o extrato (135 µL), em relação às médias de absorvância das amostras controle, que foi água destilada. A Equação 1 foi utilizada para a calcular a inibição.

$$I = \left[1 - \left(\frac{A_{2e} - A_{1e}}{A_{2c} - A_{1c}} \right) \right] \times 100\% \quad (1)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostra a Figura 2 o aspecto geral dos EBFO obtidos apresentaram uma coloração marrom esverdeada.

Figura 2 – Extrato bruto de folhas de oliveira.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados de inibição dos EBFO a uma concentração de 0,1 g/mL, preparados com diferentes tamanhos de partículas das folhas previamente cominuídas, estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Inibição dos EBFO preparados com diferentes granulometrias.

Tamanho da partícula (mm)	Tipo de filtração	Inibição <i>E.coli</i> (%)
0,272	Simple (algodão)	89,43
1,285	Simple (algodão)	68,40

Fonte: Elaborado pela autora.

Com os resultados da Tabela 1, pode-se verificar que os EBFO apresentaram efeito antimicrobiano e que com um tamanho de partícula menor houve uma maior inibição, acredita-se que com a redução do tamanho das partículas houve uma maior área de contato que favoreceu a extração da oleuropeína. Experimentos futuros serão realizados para a padronização do EBFO obtido quanto aos sólidos totais e à concentração de oleuropeína.

Mendes (2012) avaliou o efeito inibitório da oleuropeína extraída das azeitonas, frente às bactérias *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e obteve como resultado que este composto tem importância bioativa, uma vez que revelou um significativo potencial antimicrobiano.

A partir daí testou-se a inibição dos EBFO preparados com folhas com menor tamanho de partícula frente a diferentes filtrações, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Inibição dos EBFO frente às diferentes filtrações.

Tipo de filtração	Inibição <i>E.coli</i> (%)
Filtração à vácuo (papel de filtro)	79,75
Simplex (lã de vidro)	50,35
Simplex (algodão)	68,40
Simplex (tecido)	100,00

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados da Tabela 2 evidenciaram que a filtração utilizando-se o tecido de *nylon* apresentou um maior poder de inibição, a filtração por esse método deixa passar uma maior quantidade de sólidos, o que pode justificar esse resultado, acredita-se que os sólidos presentes nos EBFO continuem liberando bioativos mesmo depois da extração. Após a definição do tamanho da partícula e tipo de filtração foi executado o planejamento experimental, a fim de verificar os efeitos da temperatura e rotação. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

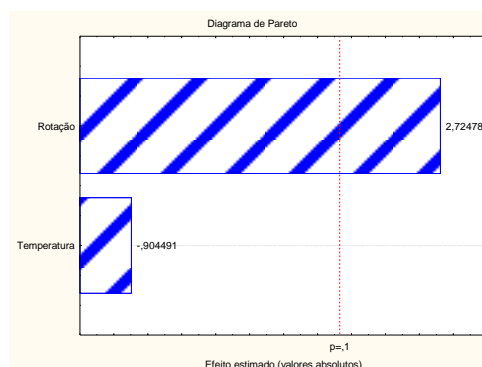
Tabela 3 - Resultados de inibição para o planejamento experimental.

Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Inibição <i>E. coli</i> (%)
25	0	83,90
75	0	67,91
25	240	100,00
75	240	100,00
50	120	100,00
50	120	100,00
50	120	100,00

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 3 ilustra o Diagrama de Pareto obtido para a avaliação dos efeitos.

Figura 3 – Diagrama de Pareto.



Fonte: Elaborado pela autora.

Através da análise do Diagrama de Pareto foi possível verificar que para o efeito antimicrobiano o efeito da temperatura não foi significativo, enquanto que o efeito da rotação foi significativo com nível de confiança de 90 %. Desta forma, observou-se que quanto maior a rotação maior inibição.

Como a temperatura não teve efeito significativo optou-se por produzir EBFO na temperatura de 25°C, por questões de economia energética, com rotação de 240 rpm e utilizando-se filtração simples com tecido de *nylon*, por apresentarem um melhor condição na obtenção dos EBFO com potencial de inibição.

Liu et al. (2017) investigou o efeito antimicrobiano de extrato bruto de folhas de oliveira e demonstraram que, a uma concentração de 62,5 mg/mL, o extrato inibiu quase completamente o crescimento *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*. Concluíram que o extrato poderia potencialmente ser utilizado no controle de agentes patogênicos em produtos alimentares.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu um estudo preliminar da atividade antimicrobiana do EBFO. No entanto, há a necessidade de investigações adicionais no que concerne a sua composição de bioativos.

Pode-se concluir que os EBFO possuem uma ação de inibição frente à linhagem bacteriana *E.coli*. Extratos preparados com tamanho de partículas foliares menores e filtrados com tecido de *nylon* apresentaram maior poder de inibição.

A partir da análise estatística verificou-se que o efeito da temperatura não foi significativo na obtenção de EBFO com potencial de inibição, enquanto que o efeito da rotação foi significativo.

Tendo em vista a inibição proporcionada pelos EBFO pode-se propor a padronização dos extratos quanto ao teor de bioativos e a concentração de oleuropeína, de forma a viabilizar sua aplicação como aditivo antimicrobiano em embalagens para alimentos em substituição aos conservantes químicos.

5. NOMENCLATURA

I	Inibição	[%]	A_{1c}	Absorvância inicial do controle	[Unidades de absorvância]
A_{1e}	Absorvância inicial do extrato	[Unidades de absorvância]	A_{1c}	Absorvância inicial do controle	[Unidades de absorvância]
A_{2e}	Absorvância final do extrato	[Unidades de absorvância]			

6. AGRADECIMENTOS

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa

7. REFERÊNCIAS

- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, v. 68, p. 457-462, 2000.
- CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.
- COUTINHO, E. F.; CAPPELARO, T. H.; RIBIERO, F. C.; HAERTER, J. A. Introdução e importância econômica. In: COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. *Cultivo de oliveira (Olea europaea L.)*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.
- DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n. 2, 2012.
- GUINDA, Á.; PÉREZ-CAMINO, Ma C.; LANZÓN, A. Supplementation of oil with oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 106, n. 1, p. 22-26, 2004.
- LIU, Y.; MCKEEVER, L. C.; MALIK, N. S. A. Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 113, 2017.
- PACETTA, C. F. *Estudo de diferentes metodologias para obtenção de extratos de folhas de oliveira (Olea europaea) contendo oleuropeína*. Pirassununga: USP, 2013.
- GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.
- MAIA, T. F. *Avaliação de extratos vegetais para obtenção de sabonetes com atividade antimicrobiana*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- MENDES, P. A. F. *Caracterização da fração fenólica e atividade biológica de azeitonas de mesa ao natural produzidas na região de Trás-os-Montes*. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2012.
- SUDJANA, A. N.; D'ORAZIO C.; RYAN V.; RASOOL N.; NG, J.; ISLAM, N.; RILEY, T.V.; HAMMER, K. A. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, p. 461-463, 2009.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. *NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4)*, Pennsylvania: NCCLS, 2003.
- UGALDE, M. L. *Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais*. Erechim: URI, 2014.