

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE *Olea europaea* L.: REVISÃO DE LITERATURA

MARTINS, Otávia de Almeida ¹;
RIPOLL, Márcia Kutscher ¹;
WALLER, Stefanie Bressan ¹;
OSÓRIO, Luiza da Gama ¹;
GOMES, Angelita Reis ¹;
FARIA, Renata Osório de ¹;
MEIRELES, Mário Carlos Araújo ¹;
MELLO, João Roberto Braga de ².

Recebido: 02/01/2021

Aceito: 15/12/2021

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária – MICVET, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; ²Médico Veterinário, Professor, Doutor, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

A oliveira (*Olea europaea*) é uma árvore característica da Região Mediterrânea, conhecida mundialmente pelo seu fruto, a azeitona. É um dos cultivos mais antigos, principalmente devido a fácil adaptação às adversidades ambientais. No estado do Rio Grande do Sul, seu cultivo teve início em 1948 e vem apresentando grande destaque. Entre outros compostos produzidos pela oliveira, os fenólicos, especialmente os polifenóis hidroxitirosol e a oleuropeína, demonstraram ação antimicrobiana *in vitro*, porém existem poucos relatos sobre a atividade antifúngica. O objetivo desta revisão foi relatar a atividade antimicrobiana de *O. europaea* e comparar os resultados dos testes realizados com as distintas variedades e extratos. Foram selecionados onze trabalhos publicados entre os anos de 2000 e 2018. Os experimentos avaliados neste estudo permitiram concluir que os diferentes extratos da oliveira, preparados através de uma extração simples, apresentaram uma satisfatória atividade antimicrobiana *in vitro*. A variedade Arbequina e o método de difusão em ágar foram os mais utilizados nos experimentos analisados. Os extratos da oliveira têm demonstrado resultados promissores relacionados a efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos. Estudos *in vivo* são necessários para confirmar a atividade terapêutica dos diversos compostos da árvore.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Oliveira. *In vitro*.

INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea*), pertencente à família *Oleaceae* é uma árvore característica da Região Mediterrânea, é um dos cultivos mais antigos, principalmente devido a fácil adaptação às adversidades ambientais (HOFFMANN, 2001; SCHLEMMER, 2011). A Região Mediterrânea é responsável atualmente por 98% do total de área cultivada de oliveiras em todo o mundo e fornece a maioria do azeite consumido no mercado internacional (EL; KARAKAYA, 2009).

A importância econômica da oliveira tem origem no seu fruto, a azeitona, que contém substâncias importantes do ponto de vista nutricional, tais como ácidos graxos insaturados, vitaminas e compostos fenólicos. Esses compostos também estão presentes no azeite de oliva (RIACHY et al., 2011). As plantas produzem dois tipos de metabólitos, os primários e os secundários. Os metabólitos primários estão relacionados com o armazenamento de energia e manutenção nutricional da vida da planta, os secundários estão envolvidos com a defesa frente a estresses bióticos ou abióticos, chamativos para insetos polinizadores ou dispersores de sementes ou até mesmo promovendo a simbiose entre planta e micro-organismos. Em relação as vias de síntese e suas semelhanças estruturais, os metabólitos podem ser divididos em três grupos, sendo classificados como compostos terpenóides, fenólicos ou nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A oleuropeína é o composto fenólico mais abundante presente nas folhas da oliveira (*O. europaea*) (AL-AZZAWIE; ALHAMDANI, 2006; AOUIDI et al., 2012), sendo considerado um éster do ácido elenólico e 3,4-dihidroxifenil etanol (TAN et al., 2003) que, após a ingestão, é metabolizado para hidroxitiroso, considerado também um importante antioxidante (ZOIDOU et al., 2014). Alguns trabalhos de pesquisa têm destacado o potencial farmacológico da oleuropeína, demonstrando suas atividades: antimicrobiana (TRIPOLI et al., 2005), antioxidante (VISIOLI et al., 2002), antiviral (MICOL et al., 2005) e anti-inflamatória (VISIOLI et al., 1998). Com isso, surgiu o interesse em estudar os métodos para sua extração bem como a aplicação em produtos nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica.

O Brasil é um grande importador de óleo de oliva, posicionando-se na lista dos 10 países de maior consumo no mundo (SÁ et al., 2019). No país a cultura da oliveira se instalou inicialmente no sul e sudeste, e em 1948 foi oficialmente introduzida no Rio Grande do Sul, através da criação do órgão especializado da Secretaria da Agricultura (Serviço Oleícola),

com a finalidade de superintender e orientar os trabalhos de fomento e pesquisa (CARDOSO; DIAS, 2018). Com o passar dos anos, alguns pioneiros plantaram em Uruguaiana (RS), olivais com mudas oriundas da Argentina com assistência técnica argentina e brasileira. Posterior a este fato, a Secretaria de Agricultura local se interessou pela oliveira e incentivou à implantação de grandes olivais em vários pontos do território gaúcho, destacando-se a Região da Campanha Gaúcha (Caçapava do Sul, Dom Pedrito e Candiota) (TERAMOTO et al., 2010). Já existem algumas experiências com a produção de oliveiras no Brasil, em microclimas favoráveis a cultura, como é o caso de algumas regiões da Serra da Mantiqueira nos estados de Minas Gerais e São Paulo, com altitudes maiores que 1.000 metros e Região Sul do Brasil, com condições naturais para cultivo, como nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (BERTONCINI et al., 2010).

Considerando-se a importância que as oliveiras e seus produtos representam para o mercado brasileiro, entidades governamentais incentivaram o seu cultivo a pequenos produtores no país, que já apresentavam áreas cultivadas a equivalente 400 ha na Região Sul (TERAMOTO et al., 2010).

No Brasil, as variedades predominantes são a Arbequina, Grappolo, Maria da Fé, entre outras (VILLA; OLIVEIRA, 2012), sendo que algumas são destinadas à produção de azeite de oliva, que é obtido por meio da compressão direta da azeitona, como a Koroneiki, Arbequina, Arbosana e Grappolo, pois conseguem obter um alto rendimento do óleo produzido pelos frutos. Arbequina é uma das mais importantes devido as suas características de vigor vegetativo, precocidade, alto rendimento em azeite e boa resistência ao ataque de pragas e doenças (OLIVEIRA et al., 2003). Cada cultivar da árvore é destinado a uma determinada produção, dependendo de suas características particulares, no rendimento do produto destinado e necessidades para adaptação ao clima de cada região (CAVALHEIRO, 2013).

Poucos são os conhecimentos agrônômicos e fitoquímicos dos materiais produzidos no país, como também de seus subprodutos, uma vez que grande parte dos materiais resultantes de poda dos olivais e da extração do azeite são descartados, sem destino produtivo (BERTONCINI et al., 2010). O objetivo desta revisão foi relatar a atividade antimicrobiana de *O. europaea* e comparar os resultados dos testes realizados com as distintas variedades e extratos, para tanto foram selecionados onze trabalhos publicados entre os anos de 2000 e 2018.

METODOLOGIA

Para este estudo, procedeu-se uma revisão da literatura utilizando as seguintes bases de dados: Medline, SciELO, PubMed, LILACS, Science Direct e Google Acadêmico. Foram avaliados artigos publicados entre os anos 2000 e 2018. As buscas foram realizadas utilizando-se as palavras-chave: extratos de vegetais, oliveira e *in vitro*. Foram selecionadas publicações que se enquadraram no tema proposto (artigos originais, artigos de revisão para verificação da conclusão, dissertações, teses e livros, escritos em língua portuguesa e em língua inglesa). Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram selecionados onze trabalhos científicos.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A escolha do método de extração é considerada uma das etapas mais críticas das pesquisas envolvendo produtos naturais. Os extratos preparados com tamanho de partículas foliares menores e obtidos após filtração com tecido apresentaram maior poder de inibição. O efeito da temperatura não é significativo na obtenção de extratos com potencial de inibição, já o efeito da rotação é significativo (MARTINY et al., 2016).

Os métodos mais utilizados para extração de compostos de uma matriz vegetal são a maceração, a extração assistida por ultrassom e a extração assistida por micro-ondas (SIMÕES et al., 2010). A eficiência do processo de extração depende de diversos parâmetros, tais como: o tipo de amostra, a substância a ser extraída e a sua localização no material vegetal, além do tipo de solvente (XYNOS et al., 2012) e da temperatura da extração (GALANAKIS et al., 2010).

Maceração

A maceração é um dos métodos mais utilizados para a obtenção de compostos fenólicos a partir de fontes vegetais, através do simples contato da droga vegetal com o líquido extrator por um período determinado; pode ser estática, quando o contato entre soluto e solvente é realizado em repouso, ou dinâmica, quando a mistura é mantida sob agitação (FALKENBERG et al., 2010). É indicada para fabricação de extratos sensíveis a degradação térmica, quando se quer manter as características sensoriais da planta e não exaurir a extração dos ativos. Este é considerado um processo simples, uma vez que emprega o aquecimento e/ou agitação, a fim de alcançar a dissolução das substâncias presentes na amostra sólida para o solvente extrator (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Jimenez et al. (2011)

estudaram a obtenção de extratos a partir folhas secas de oliveira, moídas e pré-escaldadas em água quente, e maceradas em etanol e água, por 24 horas, à temperatura ambiente, obtendo extratos hidroalcoólicos com 29% de oleuropeína.

Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom utiliza ondas sonoras de alta frequência para favorecer a penetração e a transferência de massa, aumentando a solubilidade e difusividade dos compostos (PANJA, 2018). Xie et al. (2015) constataram que as melhores condições para a extração de oleuropeína foram obtidas utilizando etanol 75%, temperatura de extração igual a 50 °C, 600 W de energia do ultrassom, tempo de extração de três minutos e pressão de extração igual a 25 kilopascal. Tais condições proporcionaram um rendimento total de oleuropeína de $7,67 \pm 0,02\%$.

Extração assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas utiliza o aquecimento do solvente através da aplicação de radiação eletromagnética gerada pelo aparelho (PANJA, 2018). Taamalli et al. (2012) avaliaram a extração de compostos fenólicos das folhas de oliveira com o auxílio de micro-ondas à temperatura de 80 °C, durante seis minutos, utilizando uma mistura de metanol/água como solvente da extração, o que resultou em um rendimento final de 16,7% para os compostos fenólicos. Em outro estudo conduzido por Japón-Luján et al. (2006), realizou-se a extração da oleuropeína das folhas de oliveira utilizando a técnica de micro-ondas, em uma mistura de etanol/água, obtendo-se assim, um teor igual a 2,3% do composto.

A extração sólido-líquido empregando solventes orgânicos, como etanol, metanol, clorofórmio e acetato de etila, por exemplo, é uma das técnicas mais utilizadas para a obtenção de compostos não voláteis. Várias técnicas podem ser aplicadas, tais como extrações a frio, empregando maceração, percolação ou turbo extração. Há também as extrações a quente que podem ser realizadas em sistemas fechados, como a extração utilizando-se o aparelho de Soxhlet, ou em sistemas abertos, como nos métodos de decocção ou infusão (FALKENBERG et al., 2010).

Sahin et al. (2011), estudaram processos de extração de compostos fenólicos a partir de fontes vegetais, por meio de Soxhlet (aparelho que utiliza o refluxo do solvente em um processo intermitente, o reagente não entra em contato com o solvente), tendo sido

avaliados vários tipos de solventes (hexano, água, metanol, etanol e a mistura de metanol/hexano), com um rendimento de oleuropeína de 37,84 mg/g de folha seca utilizando o metanol como solvente.

A extração com fluido supercrítico (TABERA et al., 2004; XYNOS et al., 2012) e a extração com fluido pressurizado (LOZANO-SÁNCHEZ et al., 2014) também foram descritas como métodos potenciais para obter oleuropeína das folhas de oliveira.

A literatura relata extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos em diversas proporções, feitos a partir de folhas verdes ou secas, de casca, de frutos, de sementes e, até mesmo, de botões florais. O uso de solventes hidroalcoólicos, obtidos a partir de diferentes proporções de água e etanol, é eficiente para a extração bruta de taninos e saponinas (FALKENBERG et al., 2010).

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos, diferentes métodos podem ser utilizados, sendo os mais conhecidos: método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição, os quais são realizados em caldo. Os métodos de difusão em ágar ou em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (CLSI, 2017). Para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) ou a concentração mínima bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado o método de microdiluição em caldo como sendo o mais confiável para avaliar agentes antimicrobianos, por fornecer resultados quantitativos e não ser influenciado pela velocidade de crescimento do micro-organismo (OSTROSKY et al., 2008). Por outro lado, Othman et al. (2011), propuseram que, tanto o uso em base caldo como em base ágar são necessários para obtenção de resultados confiáveis da atividade antimicrobiana de extratos de plantas. Embora geralmente sejam utilizadas as normatizações internacionalmente conhecidas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como base para testes de suscetibilidade antimicrobiana, as diretrizes são direcionadas para antimicrobianos com parâmetros já conhecidos. Há poucos estudos comparativos relatando qual é o melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, mesmo no que se refere às metodologias usualmente utilizadas. Além disso, há a necessidade da

uniformização dos métodos de extração e testes *in vitro*, para que a pesquisa possa ser mais eficiente e a interpretação dos resultados mais facilitada e confiável (COWAN, 1999). A ausência de padronização das metodologias limita as pesquisas sobre atividade antimicrobiana de extratos vegetais, especialmente em relação à comparação de resultados obtidos por diferentes pesquisadores, que avaliam a mesma amostra com diferentes metodologias. Isso está relacionado a um caráter multifatorial que pode modificar a inibição *in vitro* de crescimento de micro-organismos, como o método de obtenção dos extratos, a espécie de micro-organismo utilizada, a concentração da amostra e do inóculo e o método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana (KING et al., 2008).

Método de difusão

A aplicação do método de difusão se limita a micro-organismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de micro-organismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991). De acordo com a dimensão do halo os micro-organismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menor que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27 °C por 48 a 72 horas (AYRES et al., 2008; MOODY et al., 2004; SPRINGFIELD et al., 2003). As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO et al., 2003).

Método de diluição em caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO et al.,

2003). O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada do micro-organismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana. Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição (SAHM; WASHINGTON II, 1991).

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais que necessitam tratamentos mais brandos (PENNA et al., 2001).

Quanto às propriedades antimicrobianas, alguns estudos já foram realizados sobre a ação antibacteriana. Tripoli et al. (2005) revisaram os trabalhos de inúmeros pesquisadores que avaliaram a atividade bactericida *in vitro* dos componentes fenólicos (oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol) da azeitona e do azeite. Dentre eles, pode-se citar a inibição de crescimento da enterotoxina B produzida por *Staphylococcus aureus* (TRANter et al., 1993); inibição completa do desenvolvimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (AZIZ et al., 1998); eficiência antibacteriana na inibição de *Staphylococcus aureus*, espécies de *Salmonella* e espécies de *Vibrio* com oleuropeína e hidroxitirosol (BISIGNANO et al., 1999); atuações contra vírus, fungos e bactérias que afetam o sistema respiratório e gastrointestinal (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000). Medina et al. (2006) estudaram os vários componentes da azeitona e relataram que a oleuropeína foi o mais eficiente na inibição, destruindo a membrana das bactérias do estudo. Mendes (2012) demonstrou a inibição de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* quando expostos a fermentação natural de azeitonas.

Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados obtidos por diversos experimentos que avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de oliveira.

Tabela 1 - Estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos de oliveira (*Olea europaea*).

Micro-organismos testados	Inibição	Método para avaliar a atividade	Variedade das folhas de oliveira	Tipos de extratos	Autor (ano)
<i>Escherichia coli</i>	+	Difusão em ágar	N.I.	Extração sólido-líquido (Aquoso)	MARKIN et al., 2003.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+				
<i>Staphylococcus aureus</i>	+				
<i>Bacillus subtilis</i>	-				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+				
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+				
<i>Microsporum canis</i>	+				
<i>Trichophyton rubrum</i>	+				
<i>Candida albicans</i>	+				
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	Diluição em caldo	N.I.	Extração sólido-líquido	BATTINELLI et al., 2006.
<i>Microsporum canis</i>	+				
<i>Candida spp.</i>	-				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	Difusão em ágar	N.I.	Extração sólido-líquido (Etanólico)	KORUKLUOGLU et al., 2006.
<i>Saccharomyces uvarum</i>	+				
<i>Metschnikowia fructicola</i>	+				
<i>Kloeckera apiculata</i>	+				
<i>Candida oleophila</i>	+				
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+				
<i>Bacillus cereus</i>	+	Macro-caldo-diluição	N.I.	Extração sólido-líquido (Aquoso)	PEREIRA et al., 2007.
<i>Bacillus subtilis</i>	+				
<i>Staphylococcus aureus</i>	+				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+				
<i>Escherichia coli</i>	+				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+				
<i>Cândida albicans</i>	+				
<i>Cryptococcus neoforms</i>	+				

<i>Campylobacter jejuni</i>	+	Diluição em ágar e caldo técnica de microdiluição	N.I.	Azeite Comercial	SUDJANA et al., 2009.
<i>Helicobacter pylori</i>	+				
<i>Staphylococcus aureus</i>	+				
<i>Escherichia coli</i>	+	Difusão em ágar	Arbequina	Extração sólido-líquido	RIBEIRO et al., 2016.
<i>Staphylococcus aureus</i>	+				
<i>Escherichia coli</i>	+	Difusão em ágar	Arbequina	Extração sólido-líquido (Aquoso)	MARTINY et al., 2016.
<i>Escherichia coli</i>	+				
<i>Escherichia coli</i>	+	Diluição em ágar	N.I.	Azeite Comercial	BELTRAN et al., 2016.
<i>Staphylococcus aureus</i>	+				
<i>Escherichia coli</i>	+	Difusão em ágar	Arbequina Koroneike Frontoio Arbosana Manzanilha	Extração sólido-líquido (Aquoso)	ANTUNES et al., 2017.
<i>Staphylococcus aureus</i>	+				
<i>Escherichia coli</i>	+	Difusão em ágar	Arbequina	Extração sólido-líquido	MARTINY et al., 2017.
<i>Candida albicans</i>	-				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Teste de microdiluição	Arbosana e Koroneike	Extração sólido-líquido (Etanólico)	TERAMOTO et al., 2017.
<i>Escherichia coli</i>	+				
<i>Enterococcus hirae</i>	-				
<i>Staphylococcus aureus</i>	+				
<i>Staphylococcus epidermides</i>	-				
<i>Salmonella enteritidis</i>	+				
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-				

+: quando houve inibição do micro-organismo;

-: quando não houve inibição do micro-organismo;

N.I.: variedade das folhas não informada.

As diferentes metodologias utilizadas nos onze experimentos selecionados dificultaram a comparação dos resultados. Segundo Fennel et al. (2004), as variações ocorrem devido a fatores como: a técnica utilizada, o micro-organismo e as cepas utilizadas no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais, porém pode-se confirmar o seu potencial promissor como antimicrobiano dependendo do extrato, concentração e micro-organismo utilizado.

O método de difusão foi o mais utilizado nos testes, pois fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado. No método de disco-difusão, um disco de papel de filtro impregnado com uma concentração conhecida de um composto antimicrobiano é colocado na placa de ágar. O antimicrobiano se difunde no ágar de acordo com as propriedades de difusão, solubilidade e peso molecular do composto. Juntos, esses fatores resultam em valores de inibição únicos, formando halos de suscetibilidade do antimicrobiano definindo sensibilidade ou resistência microbiana, do ponto de vista clínico (BAUER et al., 1966).

A atividade antimicrobiana de *O. europaea* tem sido extensivamente investigada nas últimas quatro décadas. Esses esforços científicos se concentraram principalmente na atividade antimicrobiana global dos extratos brutos contra uma grande variedade de bactérias e alguns fungos (THIELMAN et al., 2017). Os micro-organismos testados nos estudos foram: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida* spp., *Candida albicans*, *Candida oleophila*, *Cryptococcus neoforms*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia fructicola*, *Microsporum canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*.

De maneira geral, a capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos é bem conhecida. Nas folhas de oliveira, os polifenóis hidroxitirosol e oleuropeína são os principais compostos fenólicos responsáveis pelas propriedades antimicrobianas das mesmas, estes compostos

mostraram atividade antimicrobiana *in vitro*, no entanto, ainda há pouca informação sobre a sua aplicabilidade com potencial antifúngico (PEREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; PUUPPONEN-PIMIÄ, 2001;). Outros componentes como: princípios amargos (olivamarina), flavonoides (rutina, pigmentos flavônicos), óleos essenciais, taninos, colina, derivados terpênicos, proteínas, sais minerais, ácidos orgânicos e vitaminas, certamente contribuem para os efeitos antimicrobianos observados (CAVALHEIRO et al., 2014). Além disso, os extratos podem ser mais benéficos do que os constituintes isolados, um determinado componente individual bioativo pode alterar suas propriedades na presença de outros compostos presentes nos extratos (PEREIRA et al., 2007).

De acordo com Simões et al. (2010), alguns flavonoides são responsáveis por atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Segundo Cowan (1999), os terpenos são ativos contra bactérias, vírus, fungos e protozoários. Terpenos são citados por apresentarem atividade antimicrobiana contra várias bactérias, tais como: *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e menor atividade contra *Candida albicans*, dependendo do terpeno. Assim estes compostos podem estar envolvidos, isoladamente ou em associação, na atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas. Mesmo não tendo sido realizada a análise da composição química das folhas, trabalhos mostraram que estas são ricas em compostos fenólicos. O trabalho de Pereira et al. (2007) mostrou que o uso das folhas de oliva como nutracêutico pode diminuir o risco de infecções microbianas, particularmente no trato intestinal e respiratório, principalmente por causa dos compostos fenólicos.

Os resultados dos experimentos selecionados demonstraram que os extratos das folhas da oliveira apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra inúmeros agentes patogênicos de importância, os poucos resultados divergentes podem ser explicados pelos diferentes cultivares de azeitona utilizados e pelos diferentes métodos de preparação das amostras (MARKIN et al., 2003; RANALLI et al., 2006).

CONCLUSÃO

Os extratos das folhas da oliveira demonstraram ação antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos. Nos experimentos selecionados, na maioria dos casos, os extratos foram produzidos através de uma extração simples (sólido-líquido) de folhas da

variedade Arbequina, sendo que o método de difusão em ágar foi o mais empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana.

O uso de extratos das folhas da oliveira tem demonstrado resultados promissores e eficazes podendo ser inseridos como terapia inovadora e útil no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos. Estudos *in vivo* são necessários para confirmar a atividade terapêutica dos diversos compostos da árvore.

ANTIMICROBIAL EVALUATION METHODS OF EXTRACTS OF DIFFERENT VARIETIES OF *Olea europaea* L.: LITERATURE REVIEW

ABSTRACT

The olive tree (*Olea europaea*) is a characteristic tree of the Mediterranean region, known worldwide for its fruit, the olive. It is one of the oldest crops, mainly due to its easy adaptation to environmental adversities. In the state of Rio Grande do Sul, its cultivation began in 1948 and has been showing great prominence. Among other compounds produced by the olive tree, phenolics, especially the polyphenols hydroxytyrosol and oleuropein, have demonstrated antimicrobial action *in vitro*, but there are few reports of antifungal activity. The objective of this review was to report the antimicrobial activity of *O. europaea* and to compare the results of tests carried out with the different varieties and extracts. Eleven works published between the years 2000 and 2018 were selected. The experiments evaluated in this study allowed us to conclude that the different extracts of the olive tree, prepared through a simple extraction, showed satisfactory antimicrobial activity *in vitro*. The Arbequina variety and the agar diffusion method were the most used in the analyzed experiments. Olive tree extracts have shown promising results related to anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects. *In vivo* studies are needed to confirm the therapeutic activity of the various compounds of the tree.

Keywords: Vegetable extracts. Olives. *In vitro*.

MÉTODOS DE EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE DISTINTAS VARIEDADES DE *Olea europaea* L.: REVISIÓN DE LA LITERATURA

RESUMEN

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol característico de la región Mediterránea, conocido mundialmente por su fruto, la aceituna. Es uno de los cultivos más antiguos, principalmente por su fácil adaptación a las adversidades ambientales. En el estado de Rio Grande do Sul su cultivo comenzó en 1948 y viene mostrando gran protagonismo. Entre otros compuestos producidos por el olivo, los fenoles, especialmente los polifenoles hidroxitirosol y oleuropeína, han demostrado acción antimicrobiana *in vitro*, pero hay pocos informes de actividad antifúngica. El objetivo de esta revisión fue reportar la actividad antimicrobiana de *O. europaea* y comparar los resultados de las pruebas realizadas con las diferentes variedades y extractos. Se seleccionaron once trabajos publicados entre 2000 y 2018. Los experimentos evaluados en este estudio permitieron concluir que los diferentes extractos de olivo preparados mediante una extracción simple mostraron actividad antimicrobiana satisfactoria *in vitro*. La variedad Arbequina y el método de difusión en agar fueron los más utilizados en los experimentos analizados. Los extractos de olivo han mostrado resultados prometedores relacionados con efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos. Se necesitan estudios *in vivo* para confirmar la actividad terapéutica de los diversos compuestos del árbol.

Palabras clave: Extractos vegetales. Olivera. *In vitro*.

REFERÊNCIAS

AL-AZZAWIE, H. F.; ALHAMDANI, M. S. S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, V. 78, p. 1371-1377, 2006.

ANTUNES, B. F.; SILVA, L. A.; ALVES, P. I. C.; et al. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região da campanha gaúcha. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO (ENPOS), 19, 2017, Pelotas. **ANAIS**. Pelotas: UFPEL, 2017.

AOUIDI, F.; DUPUY, N.; ARTAUD, J.; et al. Rapid quantitative determination of oleuropeína in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 292-297, 2012.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

AZIZ, N. H.; FARAG, S. E.; MOUSA, L. A.; et al. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, n. 93, p. 43-54, 1998.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. P. 1117-1125.

BATTINELLI, L.; DANIELE, C.; CRISTIANI, M.; et al. *In vitro* antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. **Phytomedicine**, v. 13, n. 8, p. 558-563, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, n. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BELTRAN, M. S.; JIMÉNEZ, M.; AMÉZQUITA-LÓPEZ, B. A.; et al. Antibacterial activity of ozonized olive (*Olea europaea* L.) and venadillo (*Swietenia humilis* zucc.) oils against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 3, p. 947-949, 2016.

BERTONCINI, E. I.; TERAMOTO, J. R. S.; PANTANO, A. P. **Desafios para produção de azeite no Brasil**, 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/DesafioOliva/index.htm> .

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 457-462, 2000.

BISIGNANO, G.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; et al. On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 971-974, 1999.

CARDOSO, C. S.; DIAS, M. F. P. Cadeia da Olivicultura. **Série Agronegócios do Sul**, p. 1-15, 2018. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/gpeia/files/2018/02/CADEIA-DA-OLIVICULTURA-1.pdf>> .

CAVALHEIRO, C. V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L.** Santa Maria, UFSM, 2013. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

CAVALHEIRO, C.V.; ROSSO, V. D.; PAULUS, E.; et al. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, p. 1874-1879, 2014.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27 - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 3. ed. Wayne: CLSI, 2017. 46p. Disponível em: <https://clsi.org/media/1897/m27ed4_sample.pdf> .

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

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

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. S.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 7. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. 1104p.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MCGAW, L. J.; et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 205-217, 2004.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 8, p. 1148-1155, 2010.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, n. 9, p. 23-30, 2001.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 4, p. 753-759, 2006.

JIMENEZ, P.; MASSON, L.; BARRIGA, A.; et al. Oxidative stability of oils containing olive leaf extracts obtained by pressure, supercritical and solvent-extraction. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 4, p. 497-505, 2011.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 231-235, 2003.

KING, T.; DYKES, G.; KRISTIANTI, R. Comparative evaluation methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 6, p. 1423-1429, 2008.

KORUKLUOGLU, M.; SAHAN, Y.; YIGIT, A.; KARAKAS, R. Antifungal activity of olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts from the Trilye Region of Turkey. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 359-362, 2006.

LOZANO-SÁNCHEZ, J.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; et al. Recovering bioactive compounds from olive oil filter cake by advanced extraction techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16270-16283, 2014.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 2010.

MARKIN, D.; DUEK, L.; BERDICEVSKY, I. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**, v. 46, n. 3-4, p. 132-136, 2003.

MARTINY, T.; RIBEIRO, P. B.; ROSA, G. S.; MORAES, C. C. Atividade antimicrobiana de extratos foliares de *Olea europaea* L. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (SIEPE), 8, 2016, Uruguaiana. **ANAIS**. Uruguaiana: Unipampa, 2016. V. 8, n. 4.

MARTINY, T. R.; SILVA, B. Z.; RIBEIRO, P. B.; et al. Extratos foliares de *Olea europaea* L.: uma alternativa aos aditivos químicos convencionais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12, 2017, São Carlos. **ANAIS**. São Carlos, UFSCar, 2017. V. 1, n. 4, p. 1-6.

MEDINA, E.; CASTRO, A.; ROMERO, C.; et al. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4954-4961, 2006.

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: ESAB, 2012. 82p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar), Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, 2012.

MICOL, V.; CATURLA, N.; PÉREZ-FONS, L.; et al. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). **Antiviral Research**, v. 66, p. 129-136, 2005.

MOODY, J. O.; ADEBIYI, O. A.; ADENIYI, B. A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 57-60, 2004.

OLIVEIRA, A. F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; et al. Influência do número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. **Ciência Agrotecnológica**, v. 27, n. 2, p. 332-338, 2003.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

- OTHMAN, M.; LOH, H. S.; WIART, C.; et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 161-166, 2011.
- PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 173-182, 2018.
- PEREIRA, A. P.; FERREIRA, I. C. F. R.; MARCELINO, F.; et al. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. **Molecules**, v. 12, p. 1153-1162, 2007.
- PEREIRA, J. A.; PEREIRA, A. P. G.; FERREIRA, I. C. F. R.; et al. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8425-8431, 2006.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; et al. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 37-40, 2001.
- PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001.
- RANALLI, A.; CONTENTO, S.; LUCERA, L.; et al. Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 434-440, 2006.
- RIACHY, M.; CAPOTE-PRIEGO, F.; LEÓN, L.; et al. Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 6, p. 678-691, 2011.
- RIBEIRO, P.; ALVES, R. C.; ROSA, G. S.; MORAES, C. C. Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato da folha de oliveira para aplicação em biofilmes. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (SIEPE), 8, 2016, Uruguaiana. **ANAIS**. Uruguaiana: Unipampa, 2016. V. 8, n. 2.
- SÁ, D. G. C. F.; CAMPOS, R. S.; FARIA-MACHADO, A. F. Aceitação de azeites de oliva da região da Mantiqueira (MG): entendendo consumidor e azeite brasileiros. **Documentos - Embrapa Agroindústria de Alimentos**, n. 138, p. 1-27, 2019.
- SAHIN, S.; BILGIN, M.; DRAMUR, M. U. Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and soxhlet methods. **Separation Science and Technology**, v. 46, n. 11, p. 1829-1837, 2011.

SAHM, D. F.; WASHINGTON II, J. A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. P. 1105-1116.

SCHLEMMER, D. **Estudo das propriedades de nanocompósitos amido/montmorilonita utilizando óleos vegetais como plastificantes**. Brasília: UnB, 2011. 191p. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 7. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. 1104p.

SUDJANA, A. N.; D'ORAZIO, C.; RYAN, V.; et al. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, p. 461-463, 2009.

SPRINGFIELD, E. P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 434-439, 2003.

TAAMALLI, A.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; et al. Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1817-1825, 2012.

TABERA, J.; GUINDA, Á.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; et al. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4774-4779, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TAN, H-W.; TUCK, K. L.; STUPANS, I.; HAYBALL, P. J. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 1, p. 187-191, 2003.

TERAMOTO, J. R. S.; BERTONCINI, E. I.; PANTANO, A. P. Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil. **Infobibos**, 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/index.htm> .

TERAMOTO, J. R. S.; SACHS, R. C. C.; REHDER, V. L. G.; et al. Atividade antimicrobiana das folhas de duas variedades de oliveira e a contextualização deste coproduto da produção paulista e mundial de azeite de oliva. **Revista Intellectus**, n. 37, v. 1, p. 63-83, 2017.

- THIELMANN, J.; KOHNEN, S.; HAUSER, C. Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 48-66, 2017.
- TRANter, H. S.; TASSOU, S. C.; NYCHAS, G. J. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 74, n. 3, p. 253-259, 1993.
- TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, M.; TABACCHI, G.; et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 98-112, 2005.
- VILLA, F.; OLIVEIRA, A. F. Origem e expansão da oliveira na América Latina. In: OLIVEIRA, A. F. (Org.). **Oliveira no Brasil: tecnologias de produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. Cap. 1. p. 21-38.
- VISIOLI, F.; BELLOSTA, S.; GALLI, C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. **Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 541-546, 1998.
- VISIOLI, F.; POLI, A.; GALLI, C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 1, p. 65-75, 2002.
- XIE, P.; HUANG, L.; ZHANG, C.; et al. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 29-38, 2015.
- XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; et al. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 89-93, 2012.
- ZOIDOU, E.; MAGIATIS, P.; MELLIOU, E.; et al. Oleuropein as a bioactive constituent added in milk and yogurt. **Food Chemistry**, n. 158, p. 319-324, 2014.

Autor para correspondência:

Otávia de Almeida Martins.

Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/nº. Faculdade de Veterinária, caixa postal 354, Capão do Leão, RS, Brasil. CEP 96 160-000.

otavia.martins@hotmail.com