



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO



INFLUENCIA DEL SECADO Y ALMACENAMIENTO EN EL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJA DE OLIVO (VAR. SERRANA).

MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

Autora:

Begoña Hussam Ahmad Qasem Mateo

Director:

José Vicente García Pérez

Centro:

Departamento de Tecnología de Alimentos

Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural

INFLUENCIA DEL SECADO Y ALMACENAMIENTO EN EL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJA DE OLIVO (VAR. SERRANA).

Ahmad Qasem Mateo, B.H.; Ahmad-Qasem, M.H.¹; Cárcel, J.A.¹, García-Pérez, J.V.¹

RESUMEN

Debido a la creciente demanda de extractos antioxidantes naturales, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la influencia que tiene el secado sobre el potencial bioactivo de extractos obtenidos a partir de hojas de olivo. Además, se ha evaluado el efecto de las condiciones de almacenamiento en la estabilidad de los extractos. En primer lugar, para evaluar la influencia del secado de la materia prima, las hojas fueron deshidratadas por aire caliente a 120 °C y liofilización. Posteriormente, una parte de los extractos fueron deshidratados por aire caliente a: 120 °C y 55 °C con vacío. Los extractos obtenidos fueron almacenados a 4, 25 y 35 °C en estado líquido o polvo, determinándose a lo largo del tiempo de almacenamiento (4 semanas) su capacidad antioxidante (CA), contenido total en compuestos fenólicos (CTF) y la concentración de los compuestos fenólicos mayoritarios.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto el secado del material vegetal como de los extractos influyó en el potencial antioxidante. El secado a 120 °C de las hojas frescas proporcionó los extractos con el contenido fenólico más alto, destacando la concentración de oleuropeína (11,2±0,9 mg/mL). Por su parte, la deshidratación de los extractos redujo, independientemente del método utilizado, la CA y el CTF en torno al 10 %. Por último, no se observó un efecto significativo ($p < 0,05$) de las condiciones de almacenamiento sobre el potencial antioxidante de los extractos.

PALABRAS CLAVE: hojas olivo, secado, extracto vegetal, capacidad antioxidante, contenido total en compuestos fenólicos, oleuropeína, almacenamiento.

RESUM

A causa de la creixent demanda d'extractes antioxidants naturals, l'objectiu del present treball ha sigut estudiar la influència que té l'assecat sobre el potencial bioactiu d'extractes obtinguts a partir de fulls d'olivera. A més, s'ha avaluat l'efecte de les condicions d'emmagatzemament en l'estabilitat dels extractes. En primer lloc, per a avaluar la influència de l'assecat de matèria primera, els fulls van ser deshidratats per aire calent a 120 °C i liofilització. Posteriorment, una part d' els extractes van ser deshidratats per aire calent a: 120 °C i 55 °C amb buit. Els extractes obtinguts van ser emmagatzemats a 4, 25 i 35 °C en estat líquid o en pols, determinant-se al llarg del temps d'emmagatzemament (4 setmanes) la seua capacitat antioxidant (CA), contingut total en compostos fenòlics (CTF) i la concentració dels compostos fenòlics majoritaris.

¹ Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios. Departamento de Tecnología de Alimentos. Camino de Vera s/n, Edificio 3F, 46022, Valencia (España).

Els resultats obtinguts van mostrar que tant l'assecat del material vegetal com dels extractes va influir en el potencial antioxidant. L'assecat a 120 °C dels fulls frescos va proporcionar els extractes amb el contingut fenòlic més alt, destacant la concentració d'oleuropeïna (11,2±0,9 mg/mL). Per la seua banda, la deshidratació dels extractes va reduir, independentment del mètode utilitzat, la CA i el CTF prop del 10 %. Finalment, no es va observar un efecte significatiu ($p < 0,05$) de les condicions d'emmagatzemament sobre el potencial antioxidant dels extractes.

PARAULES CLAU: fulls d'olivera, assecat, extracte vegetal, capacitat antioxidant, contingut total en compostos fenòlics, oleuropeïna, emmagatzemament.

ABSTRACT

Due to the increasing demand of natural antioxidant extracts, the aim of this work was to assess the influence of drying on the bioactive potential of extracts obtained from olive leaves. Moreover, the effect of storage conditions on extract stability was evaluated. In order to study the impact of the raw material drying, olive leaves were dried by hot air at 120 °C and freeze drying. After the extraction, a part of the extracts was dehydrated by hot air at 120 °C and hot air at 55 °C by applying vacuum. The obtained extracts (liquids and powders) were stored at 4, 25 and 35 °C for 4 weeks. During this period, the antioxidant capacity (AC), the total phenolic content (TPC) and the concentration of the main phenolic compounds were determined.

Results highlighted that drying of both raw material and extracts affected the antioxidant potential. Thus, hot air dried leaves (120 °C) provided the highest phenolic content, especially the oleuropein concentration (11,2±0,9 mg/mL). Regarding the extracts dehydration, independently of the method used, both AC and TPC were reduced around 10 %. Finally, stored conditions did not affect significantly ($p < 0,05$) the extracts antioxidant potential.

KEYWORDS: olive leaves, drying, vegetal extract, antioxidant capacity, total phenolic content, oleuropein, storage.

1. INTRODUCCIÓN

La superficie dedicada al cultivo del olivo (*Olea europea* L.) es de aproximadamente 8 millones de hectáreas en todo el mundo, concentrándose el 98 % del cultivo en los países del Mediterráneo (Erbay e Icier, 2010). Tradicionalmente, el olivo ha tenido un papel importante en la sociedad debido a que el aceite obtenido de su fruto ha sido muy apreciado en la dieta humana (Roche y col., 2000). No únicamente en el aceite de oliva, sino en subproductos derivados de su industrialización tales como las hojas de olivo, se han encontrado compuestos beneficiosos para la salud (Visioli y Galli, 2002). Entre ellos, destacan los polifenoles de bajo peso molecular (Dekanski y col., 2011; Raederstorff, 2009), principalmente la oleuropeína y el hidroxitiroso, de elevada actividad antioxidante (Benavente-García y col., 2000; Bouaziz y Sayadi, 2005). La oleuropeína previene enfermedades cardíacas, ayuda a combatir problemas relacionados con la obesidad, ejerce protección

enzimática, previene la muerte celular hipertensiva en pacientes con cáncer y presenta propiedades antivirales. El hidroxitirosol, principal producto de la degradación de la oleuropeína, tiene efectos similares y, además, protege frente a la arterosclerosis e inhibe la aparición de las neuropatías diabéticas (Markin y col., 2003; Ranalli y col., 2006). Otros polifenoles de interés presentes en las hojas de olivo son: rutina, verbascósido, luteolina-7-O-glucósido y luteolina-4'-glucósido (Ryan y col., 2002).

A pesar de todas sus propiedades beneficiosas, las hojas de olivo son destinadas generalmente para la alimentación animal o la quema. Sin embargo, este subproducto vegetal (que representa un 10 % del peso total de las aceitunas) podría emplearse en medicina, cosmética o en la industria alimentaria con el fin de alargar la vida útil de los alimentos o desarrollar alimentos funcionales. No obstante, para la obtención de extractos vegetales con alto potencial bioactivo procedentes de las hojas de olivo, es necesario profundizar en el estudio de su procesado y en la estabilidad de sus compuestos fenólicos (Bouaziz y col., 2008; Japón-Luján y Luque de Castro, 2007; Ranalli y col., 2003).

Generalmente, el material vegetal es deshidratado antes de la extracción de compuestos bioactivos. Con ello se pretende, en primer lugar, reducir el contenido de humedad y así, evitar que interfiera en la liberación de los compuestos fenólicos durante la extracción. En segundo lugar, la deshidratación disminuye la pérdida de calidad debida a las reacciones bioquímicas y microbiológicas que ocurren durante el almacenamiento (Kouhila y col., 2002; Soysal y Öztekin, 2001).

Además de ser una etapa importante en el acondicionamiento del material vegetal, la deshidratación también es fundamental a la hora de preservar o estabilizar los extractos, pues permite eliminar el solvente líquido y obtener un producto en forma de polvo. Actualmente, los extractos vegetales en polvo están en creciente expansión ya que presentan, frente a los extractos líquidos, numerosas ventajas: facilidad de estandarización, mayor estabilidad física, química y biológica y menores costes de transporte y almacenamiento. Por todo ello, la deshidratación de los extractos es una etapa crucial para lograr un producto adecuado para su uso industrial (Souza y col., 2008). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la deshidratación, en cierto modo, puede afectar a la actividad y estabilidad de los compuestos bioactivos debido a la degradación química, enzimática y a las pérdidas por volatilización y/o degradación térmica (Dorta y col., 2012).

El secado por aire caliente es el método de deshidratación más empleado a escala industrial por su simplicidad y alta productividad. Sin embargo, debido a las altas temperaturas empleadas, tienen lugar una serie de cambios físicos, estructurales, químicos y nutricionales que pueden afectar a la calidad del producto (Di Scala y Crapiste, 2008). Una forma de reducir la pérdida de calidad es mediante la aplicación de vacío ya que ésta facilita la evaporación del solvente a baja temperatura. Así, el secado de productos sensibles al calor es recomendable realizarlo en condiciones de vacío, controlando el calor suministrado y la temperatura del producto (Lewicki, 2006).

Por otra parte, la liofilización es el método de deshidratación que mejor preserva las características químicas y organolépticas del producto (Genin y Reneé, 1995). Los principales inconvenientes son su elevado coste y su difícil aplicación cuando se trabaja con grandes volúmenes de muestra (Raguse y Smith, 1965) puesto que el procesado se realiza en discontinuo. Otro de los métodos más empleados para el secado de extractos naturales es el secado por pulverización (spray-drying). Con esta técnica se obtienen productos deshidratados de elevada calidad, a lo que hay que

sumar su robustez y alta productividad. No obstante, la tecnología del secado por pulverización requiere un ajuste adecuado de las condiciones de proceso y es difícil de aplicar con líquidos muy viscosos debido a los problemas que crea a la hora del bombeo a presión (Gonnissen y col., 2008). Además de este método, en los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas para el secado de extractos como el uso de fluidos supercríticos (Meterc y col., 2008).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del método de secado sobre la estabilidad de extractos naturales obtenidos a partir de hojas de olivo. Además, se evaluó la influencia de las condiciones de almacenamiento en el potencial bioactivo de los extractos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima.

Para la realización del estudio se emplearon hojas de olivo (*Olea europaea* L. var. Serrana) recogidas en la finca “El Portillo” (coordenadas UTM 718.082.40, 4.406.115.18) del Término Municipal de Segorbe. Tras su recolección, las hojas fueron protegidas de la luz y almacenadas a 4 ± 1 °C hasta su procesado.

El contenido de humedad de las hojas de olivo frescas se determinó según el procedimiento de la AOAC nº 734.01 (AOAC, 1997). Para ello, las hojas se introdujeron en una estufa de vacío (Vaciotem, P- Selecta) a 70 °C y una presión de 0,2 bar hasta alcanzar peso constante.

2.2. Secado de las hojas de olivo.

Las hojas de olivo se deshidrataron utilizando dos técnicas diferentes: secado por aire caliente y liofilización. En ambos casos, una vez deshidratadas, las hojas se almacenaron a 4 ± 1 °C en bolsas plásticas termoselladas hasta su posterior utilización.

2.2.1. SECADO POR AIRE CALIENTE.

La hoja de olivo se secó a 120 °C durante 12 min, alcanzándose una pérdida de peso del 42 ± 3 % respecto del peso inicial. Para ello, se utilizó un secadero convectivo de flujo horizontal (FD, Binder), siendo la carga inicial 100 g y el flujo y la velocidad del aire $0,094$ m³/s y $0,683$ m/s, respectivamente.

2.2.2. LIOFILIZACIÓN.

La liofilización de las hojas de olivo se llevó a cabo utilizando un equipo a escala de laboratorio (LIOALFA-6, Telstar). Las condiciones experimentales utilizadas fueron: carga inicial 30 g, temperatura del condensador de -48 ± 2 °C, presión de $1,4\cdot 10^{-4}$ bar y tiempo de tratamiento 24 h, tras el cual se alcanzó una pérdida de peso del 42 ± 3 %.

2.3. Obtención de los extractos de hoja de olivo.

Con el fin de facilitar el proceso de extracción de los compuestos fenólicos, las hojas se molieron (Blixer 2, Robot Coupe) durante 8 minutos a 3000 rpm y tamizaron, seleccionándose aquellas partículas con un diámetro inferior a 0,5 mm. La extracción fue llevada a cabo en recipientes herméticos de cristal, protegidos de la luz e inmersos en un baño termostático (22 ± 2 °C) con agitación a 170 rpm (SBS40, Stuart, Staffordshire, UK) durante 24 h.

El solvente empleado fue etanol:agua (80:20, v/v) y se utilizó una relación muestra/volumen solvente de 0,125 g/mL. Los extractos obtenidos se filtraron (0,45 µm CA, Whatman Schleicher & Schuell) para eliminar impurezas y se almacenaron en recipientes herméticos protegidos de la luz. Todas las experiencias de extracción se realizaron como mínimo por triplicado.

2.4. Estabilización por secado de los extractos de hoja de olivo.

Con el fin de evaluar la influencia del estado del extracto (líquido o deshidratado) en su potencial antioxidante, parte de los extractos de hoja de olivo obtenidos fueron deshidratados mediante dos métodos diferentes: secado a 120 °C y secado a 55 °C a vacío (0,2 bar). En ambos casos se empleó una estufa (Vaciotem, P- Selecta), donde los extractos se mantuvieron hasta alcanzar peso constante. Una vez deshidratados, el polvo seco se recogió y almacenó en recipientes herméticos protegidos de la luz. Todos los secados se realizaron por triplicado.

2.5. Almacenamiento de los extractos.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en las propiedades de los extractos, éstos fueron almacenados a 4, 25 y 35 °C durante 4 semanas. De los extractos deshidratados, una parte se re-diluyó y almacenó en estado líquido, mientras que otra se almacenó como polvo (siendo re-diluida en el momento de realizar los análisis). A lo largo del tiempo de almacenamiento, los días 0, 7, 14, 21 y 28 se tomaron muestras para caracterizar en cada momento los extractos.

2.6. Evaluación del potencial bioactivo.

2.6.1. CONTENIDO TOTAL EN COMPUESTO FENÓLICOS.

La cantidad de compuestos fenólicos se determinó por el método descrito por Singleton y col. (1999). Siguiendo este procedimiento, 100 µL de muestra se mezclaron en una cubeta de 4,5 mL con 0,2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 2 mL de agua destilada. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente (25 °C) durante 3 min. Pasado el tiempo de incubación, se añadió 1 mL de Na_2CO_3 20 % (p/v) (Panreac, Barcelona, España) y se incubó nuevamente durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad. Por último, se midió la absorbancia de las muestras a 765 nm utilizando un espectrofotómetro (Helios Gamma, Thermo Spectronic, Cambridge, UK). Todos los ensayos se realizaron, al menos, por triplicado.

Para poder expresar las absorbancias medidas con el espectrofotómetro en concentraciones equivalentes de ácido gálico (GAE), se realizó una recta de calibrado con disoluciones de concentraciones de ácido gálico conocidas (Sigma-Aldrich, Madrid, España) utilizando el mismo solvente que en la extracción (etanol:agua, 80:20, v/v). Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico (GAE) por mL de extracto.

2.6.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

La medida de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP (Ferric-reducing ability power) se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones (Pulido y col., 2000). En primer lugar, se preparó el reactivo FRAP a partir de las siguientes disoluciones (1:1:1): tampón acetato sódico anhidro (Panreac, Barcelona, España) 0,3 M pH 3,6, TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina; Fluka, Steinheim, Alemania) 10 mM en HCl 40 mM y FeCl₃ 6H₂O (Panreac, Barcelona, España) 20 mM. A continuación, se mezclaron 30 µL de agua destilada, 30 µL de muestra o blanco y 900 µL de reactivo FRAP, la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm utilizando un espectrofotómetro (Helios Gamma, Thermo Spectronic, Cambridge, UK). Todas las medidas se realizaron, al menos, por triplicado.

La capacidad antioxidante fue evaluada a partir de una recta de calibrado que permitió transformar la absorbancia en concentración de trolox (Sigma-Aldrich, Madrid, España). La recta fue obtenida a partir de disoluciones de trolox de concentración conocida utilizando el mismo solvente que en la extracción (etanol:agua, 80:20, v/v). Los resultados fueron expresados como mg de trolox por mL de extracto.

2.6.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS POLIFENÓLICOS (HPLC-DAD/MS-MS).

Con el fin de identificar y cuantificar los principales compuestos presentes en los extractos de hoja de olivo, las muestras se analizaron empleando un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC serie 1100, Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) controlado por el programa Chemstation. El equipo de HPLC fue acoplado a un espectrómetro de masas (Esquire 3000+, Bruker Daltonics, GmbH, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electronebulización (ESI) y un analizador de masas de trampa de iones, y controlado con el programa Esquire para el control y análisis de datos. Se empleó como fase estacionaria una columna Merk Lichrospher 100RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm) termostatada a 30-35 °C y como fases móviles (A) ácido acético al 2,5 % y (B) acetonitrilo.

La separación se llevó a cabo a través de un método de gradiente lineal utilizando ácido acético al 2,5 % (v/v) (A) y acetonitrilo (B), empezando la secuencia con 10 % B y programando el gradiente para obtener a los 10 min 20 % B, a los 35 min 40 % B, a los 40 min 100 % B, a los 45 min 100 % B, un 10 % de B a los 46 min y un 10 % B a los 50 min. El flujo fue de 1 mL/min y los cromatogramas monitorizados a 240, 280 y 330 nm. Las condiciones operativas del espectrómetro de masas se optimizaron para poder alcanzar la máxima sensibilidad. La fuente de ionización por electronebulización (ESI) del espectrómetro de masas operó en modo negativo para generar los iones [M-H]⁻ bajo las siguientes condiciones: temperatura de disolución de 365 °C, temperatura

de vaporización 400 °C; flujo de nitrógeno seco 12 L/min y una presión en el nebulizador de 4,83 bar. Los datos provenientes del detector de masas fueron adquiridos en un rango de 50 a 1100 m/z, usando un tiempo de captura para los iones dentro de la trampa de 200 ms.

Los principales compuestos fueron identificados mediante HPLC-DAD (Cromatografía Líquida de Alta Presión- Diodo Array), comparando el tiempo de retención, el espectro UV y los datos de la espectrometría de masas (MS-MS) de los picos encontrados en las muestras con los datos de los compuestos encontrados en la literatura.

Para la cuantificación de los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en los extractos se emplearon patrones comerciales: oleuropeína (Extrasynthese, Genay Cedex, Francia) y luteolina-7-O-glucósido (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Alemania). En el caso del verbascósido se utilizó un extracto purificado (96,85 %) proporcionado por la Universidad Miguel Hernández (Elche, España). La evaluación cuantitativa de los compuestos se realizó con una curva de calibrado para cada polifenol, utilizando soluciones de etanol (oleuropeína) o metanol (verbascósido y luteolina) de concentración conocida. La concentración de los compuestos se expresó como mg de polifenol por mL de extracto.

2.7. Resumen de la metodología experimental.

En la Figura 1 se muestra un resumen del trabajo experimental realizado. En primer lugar, se realizaron dos tipos de deshidratación de la hoja de olivo: secado a 120 °C y liofilización. A partir de estos dos materiales deshidratados y de hojas frescas, se obtuvieron extractos que fueron almacenados a 4 °C y caracterizados sus cambios en compuestos bioactivos a lo largo de 4 semanas. Así, pudo estudiarse la influencia del secado del material vegetal y el tiempo de almacenamiento sobre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico de los extractos.

A continuación, se realizó una nueva serie de experimentos con los extractos obtenidos a partir de las hojas secadas a 120 °C. Los extractos se estabilizaron mediante secado a 120 °C y a 55 °C con vacío. De esta manera, se pretendió evaluar si el secado del extracto influyó en su potencial antioxidante.

Posteriormente, una parte de los extractos deshidratados fue re-diluida y almacenada en estado líquido, mientras que otra se almacenó como polvo. Los extractos se sometieron a distintas condiciones de almacenamiento durante 4 semanas: refrigeración (4 °C), T^a ambiente (25 °C) y alta temperatura (35 °C). Así, se evaluó cómo el tiempo y las condiciones de almacenamiento del extracto afectaron a la capacidad antioxidante y el contenido fenólico.

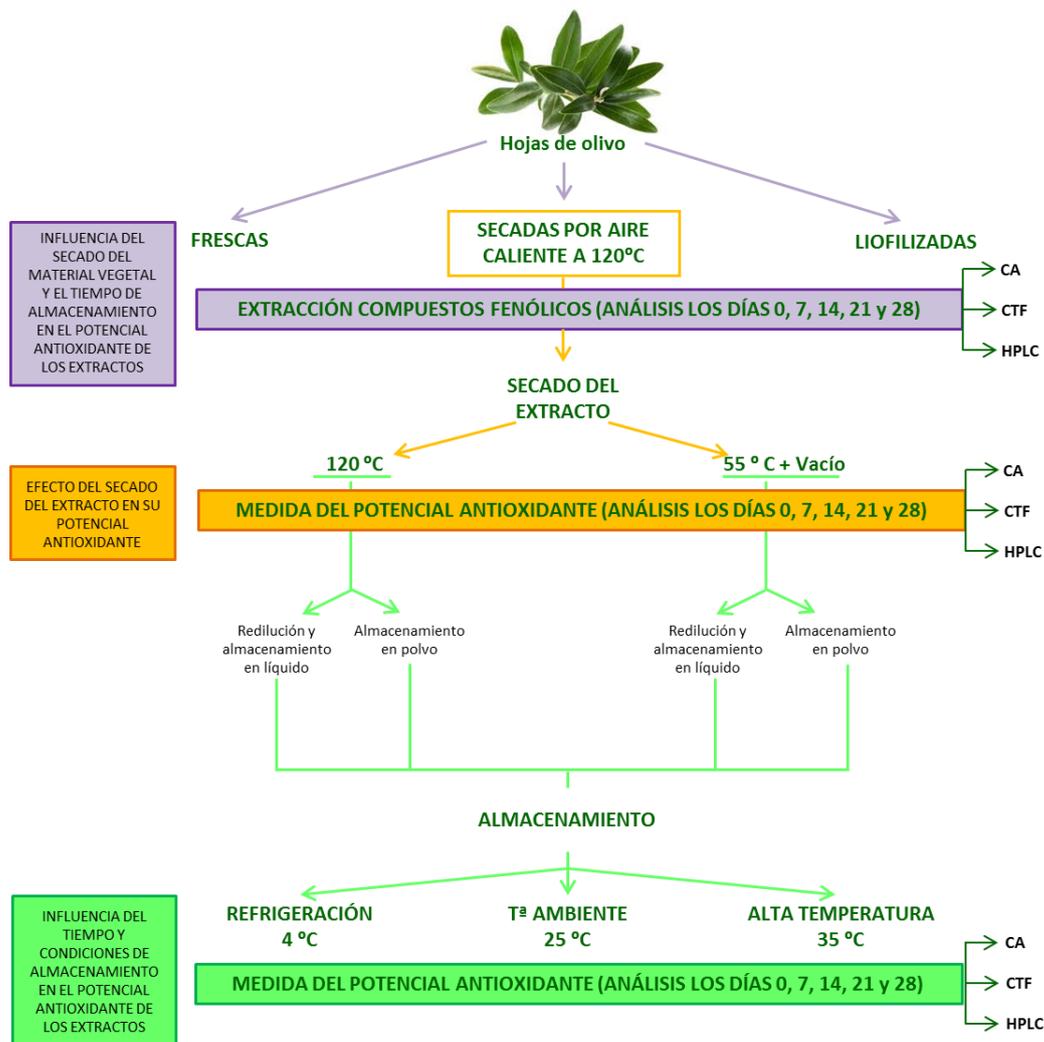


FIGURA 1. Resumen del trabajo experimental.

2.8. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con el fin de determinar los efectos significativos de las variables objeto de estudio, adoptando un nivel de significancia de 95 %. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Plus 5.1 (Gráficos Estadísticos, Rockville, MD, EE.UU.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Influencia del secado de la materia prima en la evolución del potencial antioxidante de los extractos durante su almacenamiento.

Con el fin de determinar la influencia del secado de las hojas de olivo sobre la evolución del potencial antioxidante de los extractos durante su almacenamiento (4 °C), la materia prima fue deshidratada mediante dos métodos de secado diferentes: aire caliente a 120 °C (AC-120) y liofilización (LF). Además, los extractos obtenidos a partir del material deshidratado se compararon con los obtenidos a partir del material fresco.

Como puede observarse en la Figura 2, el método de secado influyó de manera significativa ($p < 0,05$) tanto en la capacidad antioxidante (CA) como en el contenido total en compuestos fenólicos (CTF) de los extractos. Así, mientras que las hojas frescas y las LF mostraron un potencial antioxidante (CA y CTF) similar, las hojas AC-120 presentaron una CA ($11,51 \pm 0,03$ mg trolox/mL extracto) y un CTF ($7,17 \pm 0,09$ mg GAE/mL extracto) significativamente ($p < 0,05$) superiores. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Siddhuraju (2007), quien observó que los extractos obtenidos a partir de semillas de *Tamarindus indica* secadas a alta temperatura (135 °C) mostraron una capacidad antioxidante más alta que los extractos obtenidos a partir del material fresco. Por lo tanto, a pesar de que las altas temperaturas no se consideran en la bibliografía adecuadas para el tratamiento de algunos subproductos vegetales con alto contenido fenólico (Dorta y col., 2012), en este estudio el secado por aire caliente a 120 °C proporcionó los extractos de hoja de olivo con mayor potencial antioxidante.

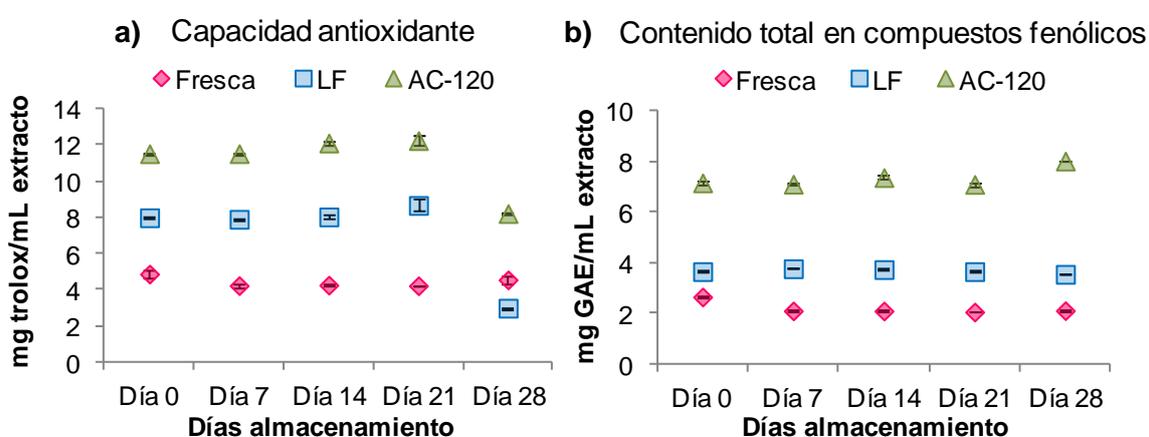


FIGURA 2. Evolución de la Capacidad antioxidante (a) y Contenido total en compuestos fenólicos (b) de los extractos obtenidos de hojas de olivo frescas, secadas por aire caliente a 120 °C (AC-120) y liofilizadas (LF) durante el almacenamiento a 4 °C.

La influencia positiva del secado a alta temperatura en el potencial antioxidante de los extractos podría ser debida, entre otros factores, al estrés provocado sobre la estructura vegetal. Durante el secado AC-120, las altas temperaturas ejercen gran presión sobre las paredes celulares mientras que durante la liofilización, el estrés es debido al daño ocasionado por la formación de cristales de hielo. En ambos casos, el secado provoca la degradación de la pared celular facilitando la eliminación de agua (Hossain y col., 2010) y, a su vez, la extracción de compuestos intracelulares como los polifenoles y las enzimas oxidativas, destacando entre ellas la polifenoloxidasas. Las altas temperaturas empleadas durante el secado por aire caliente podrían desactivar las enzimas, evitando y/o minimizando la degradación de los compuestos fenólicos (Ortega-García y col., 2008). Sin embargo, las bajas temperaturas empleadas en LF mantendrían las enzimas en estado latente. Por lo tanto, durante la extracción, las enzimas latentes presentes en el material LF recuperarían su capacidad oxidativa disminuyendo el potencial antioxidante del extracto. Por su parte, en las hojas frescas, las enzimas se encuentran activas promoviendo su liberación y la degradación de los compuestos fenólicos mediante la molienda y extracción, respectivamente.

El almacenamiento de los extractos obtenidos a partir de las hojas secadas (AC-120 y LF) y frescas se realizó a 4 °C ya que las bajas temperaturas reducen la

actividad de la polifenoloxidasa y peroxidasa (Balois-Morales y col., 2007). De este modo, pudo evaluarse únicamente el efecto del método de secado sobre el potencial antioxidante y la composición de los extractos a lo largo del tiempo. La evolución de la CA (Figura 2a) puso de manifiesto que el secado de la materia prima únicamente tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) durante el almacenamiento a partir del día 21. Hasta ese momento, los tres tipos de extractos mantuvieron prácticamente constante su CA. Sin embargo, a partir del día 21 en los extractos AC-120 y LF se produjo una caída de la CA del 35 % y 61 %, respectivamente. Por el contrario, la CA de los extractos obtenidos a partir de las hojas frescas fue, al final del almacenamiento, prácticamente igual que la inicial. En cuanto a la evolución del CTF, a diferencia de la CA, no se observó ningún descenso independientemente del procesado de la materia prima. Esto podría ser debido a la capacidad que tienen los compuestos fenólicos para reaccionar entre sí y/o degradarse dando lugar a compuestos con mayor o menor capacidad antioxidante (Ryan y col., 2003).

Con el fin de profundizar en la composición de los diferentes extractos, se identificaron (Figura 3 y Tabla 1) y cuantificaron los principales compuestos fenólicos (Figura 4). El perfil fenólico fue el mismo en todos los casos, coincidiendo con el de otros extractos de hoja de olivo que han sido previamente caracterizados en la bibliografía (Benavente-García y col., 2000). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los extractos en la concentración de los compuestos mayoritarios (oleuropeína, verbascósido y luteolina-7-O-glucósido). Las concentraciones más altas de estos compuestos (Figura 4) correspondieron a los extractos con mayor CA y CTF, es decir, los obtenidos a partir de las hojas AC-120. Cabe destacar la alta concentración de oleuropeína conseguida con el secado por aire caliente a 120 °C ($11,2 \pm 0,9$ mg oleuropeína/mL extracto). Esta concentración fue prácticamente 5 y 17 veces superior a la obtenida en los extractos de hojas LF y frescas, respectivamente. Además de la ya mencionada actividad enzimática en las hojas LF y frescas, en estas últimas, las bajas concentraciones polifenólicas podrían deberse a que no se esté extrayendo todos los compuestos fenólicos. Esto se debería a que, como se ha mencionado anteriormente, el secado previo facilita la liberación de los compuestos al solvente.

TABLA 1. Identificación de los principales compuestos de los extractos de hoja de olivo mediante HPLC-ESI-MS/MS.

Nº Pico	Compuesto fenólico	Masa molecular (g/mol)	Tiempo de retención (min)
1	Apigenina-6,8-diglucósido	594,52	9,76
	Apigenina-6,8-diglucósido (isómero)	594,52	12,42
2	Luteolina-3',7-di-O-glucósido	610,52	11,53
	Luteolina-3',7-di-O-glucósido (isómero)	610,52	12,42
3	Verbascósido	624,60	15,05
4	Luteolina-7-O-glucósido	448,38	15,79
	Luteolina-7-O-glucósido (isómero)	448,38	19,11
5	Apigenina-7-rutinósido	578,53	17,61
6	Apigenina-6,8-diglucósido	594,52	18,12
7	Oleuropeína	540,52	19,67
	Oleuropeína (isómero)	540,52	21,80

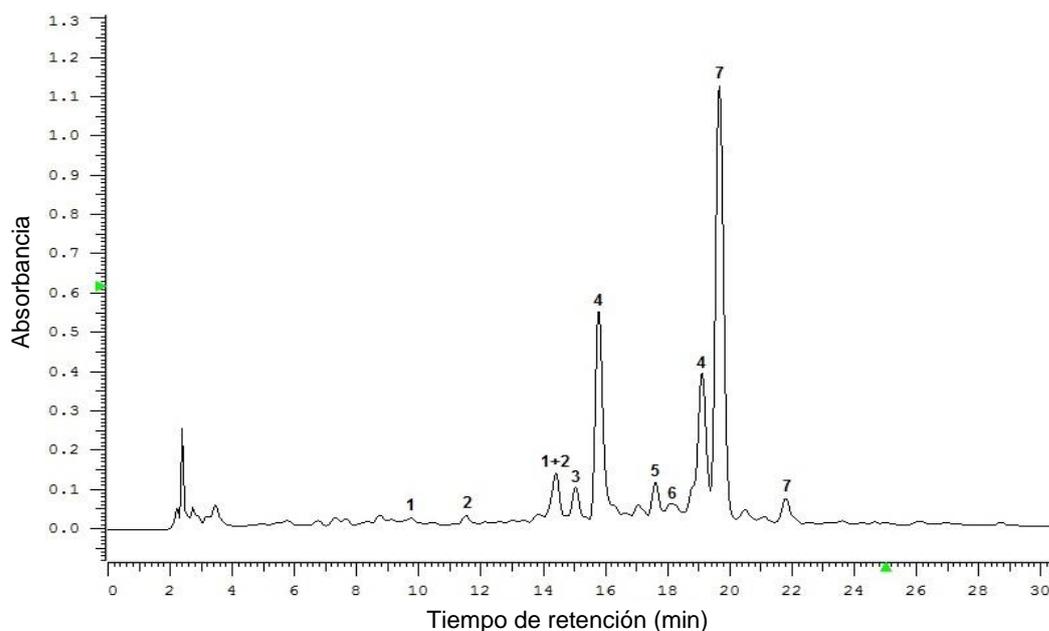


FIGURA 3. Cromatograma a 280 nm del extracto obtenido a partir de hojas secadas a 120 °C (AC-120).

Durante el almacenamiento pudo apreciarse que la influencia del secado del material vegetal fue distinta para cada uno de los compuestos estudiados. Así, aunque no se observó una tendencia clara se pueden destacar algunos aspectos. A partir de los 14 días de almacenamiento, se observó un aumento en el contenido de oleuropeína (Figura 4a) tanto en las muestras AC-120 como en las LF, incrementándose el contenido inicial en un 10,3 y 55,1 %, respectivamente. El método de secado influyó significativamente ($p < 0,05$) en el contenido de verbascósido conseguido al final del almacenamiento (Figura 4b), así en comparación con el día 0, éste aumentó en los extractos AC-120 (7,7 %) mientras que disminuyó en los LF (7,9 %). En cuanto a la luteolina-7-O-glucósido (Figura 4c), el secado de la materia prima promovió la degradación de este compuesto a lo largo del almacenamiento. Sin embargo, su contenido se mantuvo e incluso aumentó ligeramente en los extractos obtenidos a partir de material fresco. En base a los resultados obtenidos, el comportamiento de un mismo compuesto fenólico durante el almacenamiento podría verse influenciado por el resto de compuestos fenólicos (mayoritarios y minoritarios) que le acompañan en el extracto.

En vista de los resultados obtenidos, parece que las concentraciones de los compuestos mayoritarios, oleuropeína y verbascósido, contribuyen a mantener el CTF de los extractos durante el almacenamiento. No obstante, el descenso de la CA observado al final del almacenamiento podría atribuirse tanto a la degradación de la luteolina-7-O-glucósido, y otros compuestos minoritarios, como a la antes mencionada transformación de unos compuestos polifenólicos en otros con menor capacidad antioxidante. Por ejemplo, el hidroxitirosol, producto de la degradación de la oleuropeína y, a su vez, precursor de la misma, posee una mayor capacidad antioxidante (Benavente-García y col., 2000). Así, la formación de oleuropeína (Figura 4a) a partir de hidroxitirosol reduciría la CA del extracto (Figura 2a).

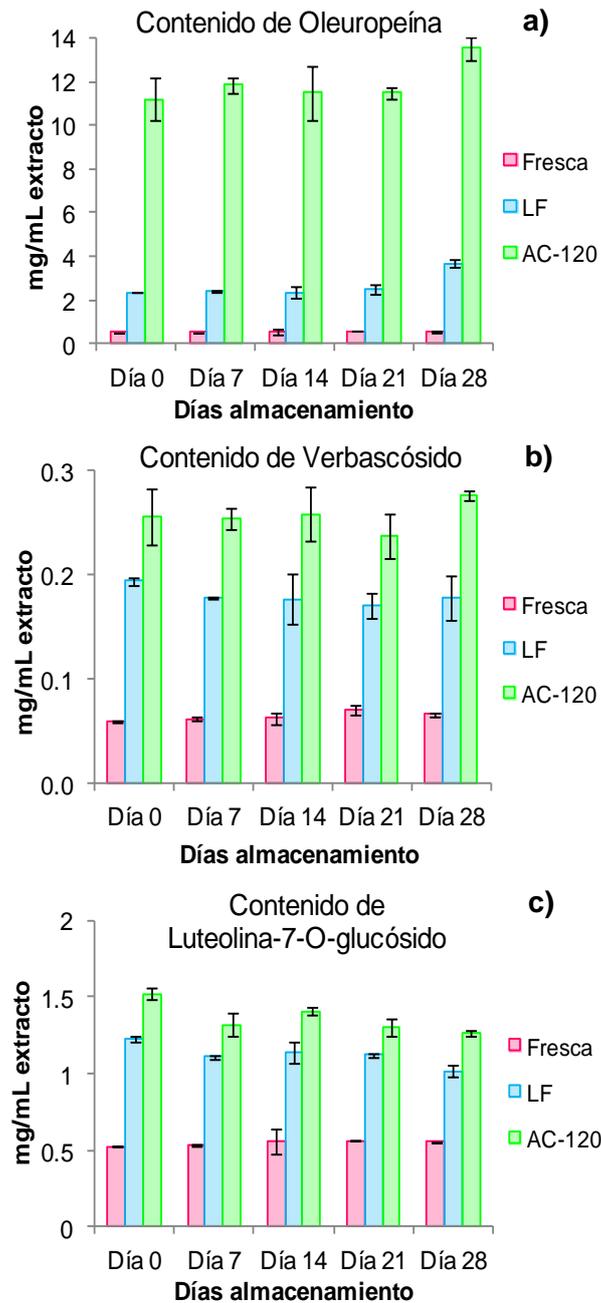


FIGURA 4. a) Evolución del contenido de oleuropeína (a), verbascósido (b) y luteolina-7-O-glucósido (c) durante el almacenamiento a 4 °C de extractos obtenidos a partir de hojas frescas, secadas por aire caliente a 120 °C (AC-120) y liofilizadas (LF).

3.2. Influencia del método de deshidratación del extracto en su potencial antioxidante.

Con el objetivo de evaluar la influencia del método de deshidratación de los extractos en su potencial antioxidante, los extractos AC-120 se deshidrataron a 120 °C (AC-120) y 55 °C a vacío (0,2 bar) (55 °C+V). Posteriormente, los extractos fueron re-diluidos para analizar la CA, el CTF y el contenido de los compuestos fenólicos mayoritarios.

La deshidratación del extracto tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) en su potencial antioxidante (Tabla 2). Así, independientemente del método de secado, se encontró

una reducción de la CA y el CTF en torno al 10 %. Estos resultados son similares a los obtenidos en el secado de otros extractos naturales ricos en compuestos antioxidantes aplicando distintas técnicas. Así, Fang y Bhandari (2011), tras el secado por atomización de zumo de arrayán (bayberry) consiguieron retener el 94 % de la CA y el 96 % del CTF de los extractos. Por su parte, Benelli y col. (2013) consiguieron secar extractos de plantas aromáticas mediante “spouted bed” alcanzando un 91,48 % del CTF original. Esta reducción del potencial antioxidante inicial de los extractos podría deberse a varios factores. En primer lugar, los compuestos fenólicos ya extraídos del material vegetal y presentes en el extracto tienen un mayor contacto con el oxígeno del aire de secado, lo que favorecería la oxidación de los compuestos bioactivos (Nicoli y col., 1999). En segundo lugar, las altas temperaturas pueden promover la degradación y/o volatilización de algunos compuestos termosensibles (Dorta y col., 2012), ya que en este caso los compuestos fenólicos están menos protegidos que durante el secado de la materia prima.

TABLA 2. Caracterización del extracto inicial de hojas de olivo secadas a 120 °C y del extracto deshidratado a 120 °C (AC-120) y 55 °C a vacío (0,2 bar) (55 °C+V).

	Inicial	Secado a 120 °C	Secado a 55 °C+V
Capacidad antioxidante (mg trolox/mL extracto)	13,40±0,09 ^a	12,1±0,2 ^b	12,4±0,5 ^b
Contenido total en compuestos fenólicos (mg GAE/mL extracto)	8,20±0,03 ^a	7,60±0,05 ^b	7,33±0,04 ^b
Oleuropeína (mg oleuropeína/mL extracto)	12±1 ^a	10,9±0,3 ^b	13,7±0,8 ^a
Verbascósido (mg verbascósido/mL extracto)	0,30±0,02 ^a	0,2600±0,0114 ^a	0,291±0,013 ^a
Luteolina-7-O-glucósido (mg luteolina-7-O-glucósido/mL extracto)	1,330±0,006 ^a	1,20±0,03 ^b	1,31±0,08 ^a

A pesar de que el secado a 55 °C+V disminuyó la CA y CTF, no afectó significativamente ($p < 0,05$) al contenido de ninguno de los compuestos fenólicos cuantificados, siendo sus concentraciones muy similares a las determinadas en el extracto inicial (Tabla 2). Por el contrario el secado a 120 °C redujo de manera significativa ($p < 0,05$) el contenido de oleuropeína y luteolina-7-O-glucósido. El efecto negativo de las altas temperaturas sobre la concentración de luteolina, compuesto perteneciente a la familia de los flavonoides, coincidió con el observado en otros flavonoides como la diadzeína y genisteína (Ungar y col., 2003).

Las diferencias entre los dos métodos empleados para la deshidratación del extracto de hoja de olivo podrían considerarse mínimas, ya que únicamente se encontraron diferencias en los contenidos de oleuropeína y luteolina-7-O-glucósido. En cambio, sí existió una clara influencia del método de deshidratación en el tiempo de secado, siendo éste de 4,5 y 19,5 h para 120 °C y 55 °C+V, respectivamente. Consecuentemente, de cara a la aplicación industrial del secado de los extractos de hoja de olivo mediante aire caliente, sería más recomendable el secado a 120 °C. Éste, no sólo reduciría los tiempos de procesado sino que también abarataría el coste al permitir trabajar en continuo y sin la necesidad de utilizar equipos de vacío.

3.3. Influencia de las condiciones de almacenamiento en el potencial antioxidante de los extractos.

Con el fin de evaluar la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el potencial antioxidante de los extractos de hojas de olivo deshidratados, éstos fueron almacenados en forma líquida (re-diluidos tras su secado) y en polvo a diferentes temperaturas: 4, 25 y 35 °C durante 28 días.

Los resultados obtenidos mostraron que ni el estado de los extractos (líquido o polvo) ni la temperatura de almacenamiento influyeron de manera significativa ($p < 0,05$) en la CA (Figura 5) de los extractos. En general, la CA presentó una ligera tendencia a aumentar hasta los 21 días de almacenamiento. A partir de ese momento, se produjo una reducción que dio lugar a valores finales de CA cercanos a los iniciales (día 0). Este descenso durante la última semana de almacenamiento coincidió con el anteriormente mencionado para los extractos almacenados a 4 °C obtenidos directamente de las hojas de olivo deshidratadas (Figura 2a). A pesar de no haber una clara influencia de las condiciones de almacenamiento, sí pudo apreciarse alguna particularidad. Los extractos deshidratados a 120 °C y almacenados como polvo presentaron valores ligeramente más altos que los extractos líquidos, destacando a 4 y 25 °C un incremento de la CA inicial de 4,9 y 9,5 %, respectivamente (Figura 5c).

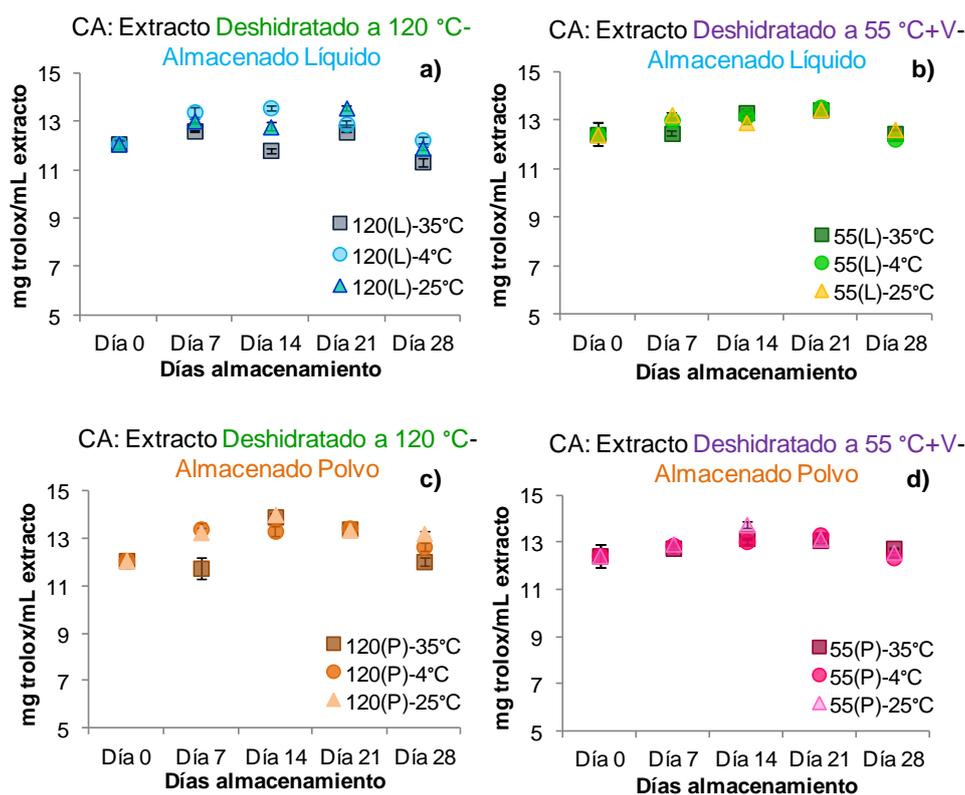


FIGURA 5. Evolución de la capacidad antioxidante (CA) a 4, 25 y 35 °C de los extractos a) deshidratados a 120 °C y almacenados en forma líquida (re-diluidos), b) deshidratados a 55 °C a vacío (55 °C+V) y almacenados en forma líquida (re-diluidos), c) deshidratados a 120 °C y almacenados en polvo y d) deshidratados a 55 °C a vacío (55 °C+V) y almacenados en polvo.

En cuanto al CTF (Figura 6), al igual que la CA, su evolución durante el almacenamiento mostró una tendencia similar a los extractos sin deshidratar (Figura 2b), manteniéndose el CTF prácticamente constante. En cuanto a la influencia de las condiciones de almacenamiento, los extractos deshidratados a 120 °C (Figura 6a y 6c) apenas mostraron diferencias en su CTF, independientemente del estado del extracto y la temperatura de almacenamiento. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en los extractos deshidratados a 55 °C+V (Figura 6b y 6d). En este caso, a los 28 días, sí hubo una reducción del 32,4 % del CTF en los extractos almacenados en polvo a 35 °C (55(P)-35 °C). Así, la temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) en los extractos secados a 55 °C+V y almacenados en polvo (Figura 6d).

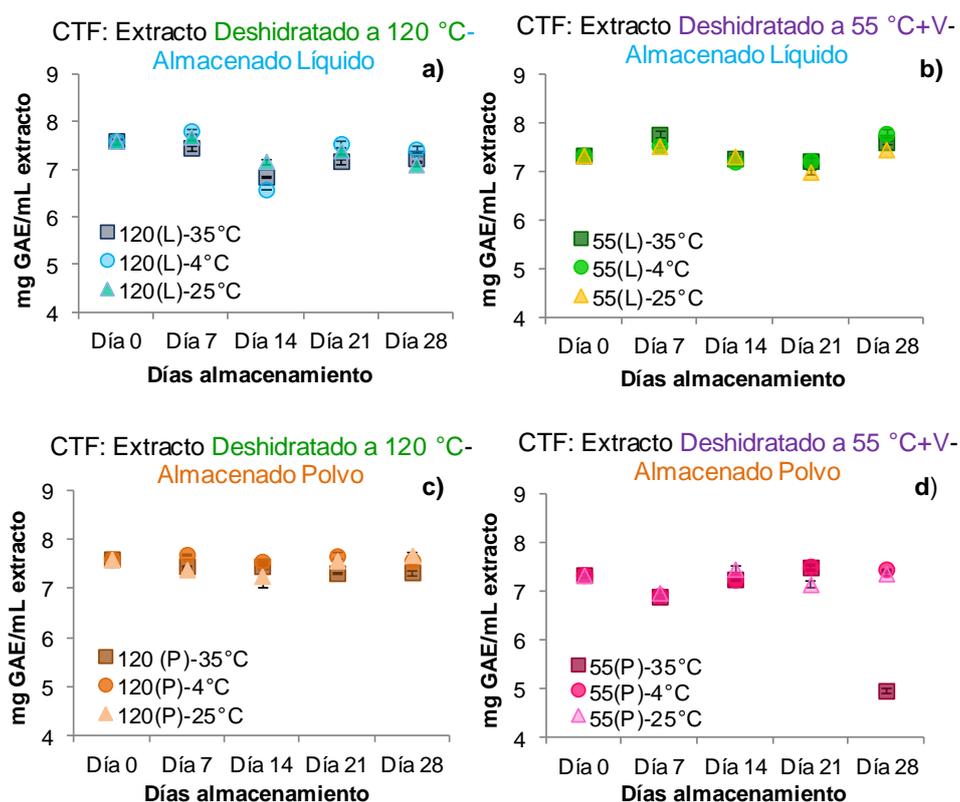


FIGURA 6. Evolución del contenido total en compuestos fenólicos (CTF) a 4, 25 y 35 °C de los extractos a) deshidratados a 120 °C y almacenados en forma líquida (re-diluidos), b) deshidratados a 55 °C a vacío (55 °C+V) y almacenados en forma líquida (re-diluidos), c) deshidratados a 120 °C y almacenados en polvo y d) deshidratados a 55 °C a vacío (55 °C+V) y almacenados en polvo.

Los resultados obtenidos para la CA y CTF, difieren de los observados por Flores y col., (2014) en el almacenamiento a distintas temperaturas de extractos de orujo de arándano encapsulados y deshidratados por atomización, donde con el transcurso de los días se apreció un incremento tanto de la concentración total de compuestos fenólicos como de la capacidad antioxidante. Los extractos de hoja de olivo no mostraron ese incremento en el potencial antioxidante durante su almacenamiento. Sin embargo, podría afirmarse que a las temperaturas estudiadas, tanto los extractos líquidos (con alta actividad de agua) como los polvos fueron capaces de mantener el potencial antioxidante inicial. Este hecho también se contrapone a otros estudios

donde el incremento de la temperatura de almacenamiento y la actividad de agua del extracto atomizado favorecieron la degradación del contenido en compuestos fenólicos y la reducción de la capacidad antioxidante (Fang y Bhandari, 2011; Vongsak y col., 2013).

Las condiciones de almacenamiento tampoco tuvieron una influencia significativa ($p < 0,05$) en la evolución del contenido de los compuestos polifenólicos mayoritarios. Por esta razón, en la Figura 7 únicamente se muestran los contenidos de estos compuestos al final del periodo de almacenamiento.

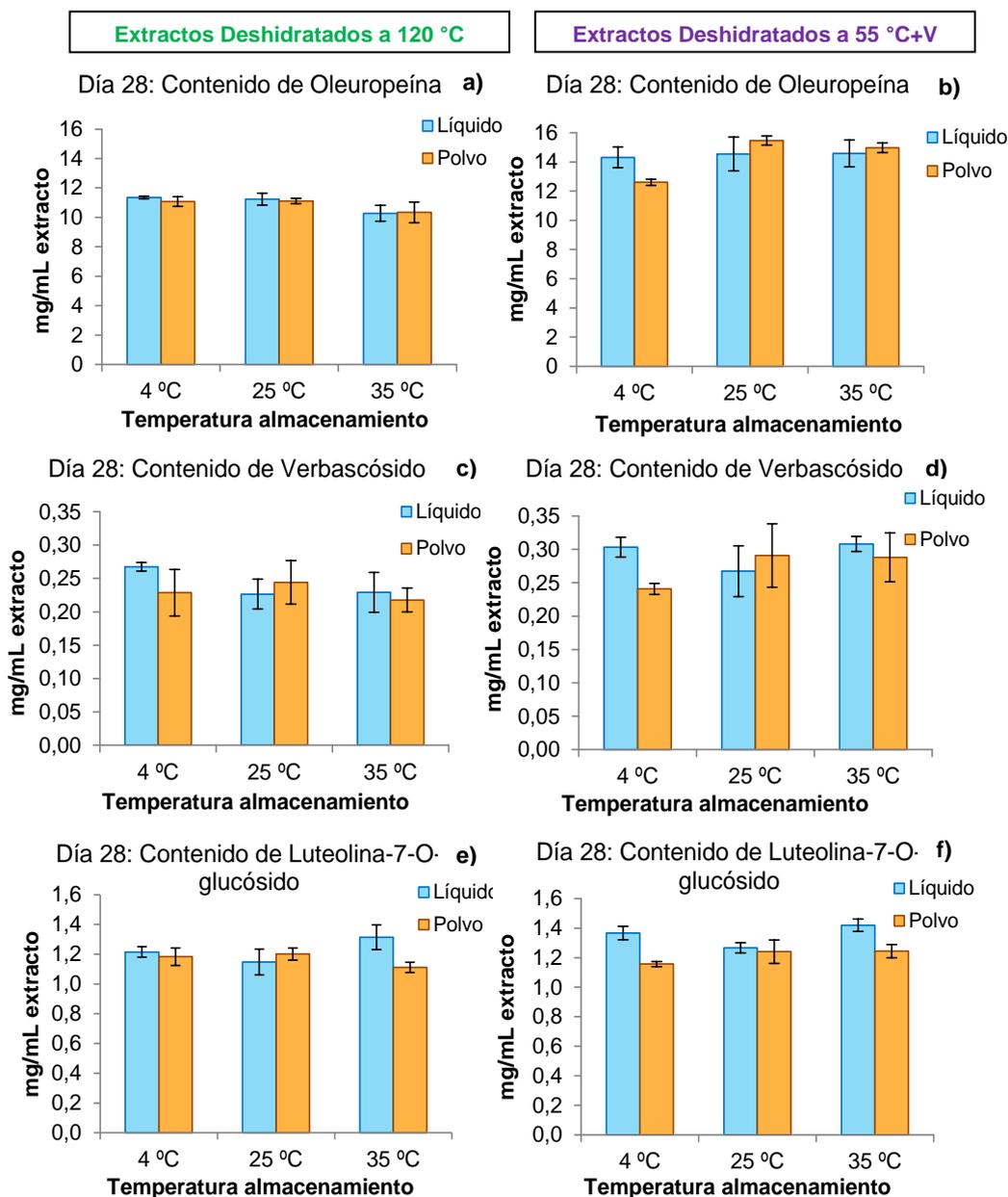


FIGURA 7. Contenido en oleuropeína de los extractos a) deshidratados a 120 °C y b) deshidratados a 55 °C a vacío (55 °C+V); verbascósido de los extractos c) deshidratados a 120 °C y d) deshidratados a 55 °C a vacío (55 °C+V) y luteolina-7-O-glucósido de los extractos e) deshidratados a 120 °C y f) deshidratados a 55 °C a vacío (55 °C+V), a los 28 días de almacenamiento.

Ninguna de las combinaciones de las condiciones de almacenamiento supuso una reducción drástica del contenido final de los compuestos fenólicos cuantificados (Tabla 2 y Figura 7). No obstante, el estado de los extractos (polvo o líquido), afectó especialmente a los extractos 55 °C+V almacenados a 4 °C. En ellos, la concentración de los compuestos polifenólicos en el polvo fue menor que en la muestra líquida. Las diferencias fueron del 11,9, 20,6 y 15,4 % para la oleuropeína (Figura 7b), verbascósido (Figura 7d) y luteolina-7-O-glucósido (Figura 7f), respectivamente.

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, podría afirmarse que los extractos de hoja de olivo deshidratados son estables durante, al menos, 30 días independientemente de la temperatura de almacenamiento y el estado del extracto polvo o reconstituido como líquido.

4. CONCLUSIONES

El secado de la hoja de olivo tuvo un efecto significativo en el potencial antioxidante de los extractos. Así, el secado a altas temperaturas (120 °C), resultó ser el método de secado que proporcionó los extractos con mayor capacidad antioxidante y mayores contenidos de oleuropeína, verbascósido y luteolina-7-O-glucósido. En cuanto a la deshidratación de los extractos, ésta únicamente supuso una reducción de alrededor del 10 % del potencial bioactivo, siendo mínimas las diferencias entre la deshidratación a 120 °C y 55 °C+V. El estudio del almacenamiento de los extractos puso de manifiesto que, durante 4 semanas, el potencial antioxidante de los extractos de hoja olivo podría considerarse estable independientemente del estado del extracto (líquido o polvo) y la temperatura de almacenamiento.

5. REFERENCIAS

- AOAC (1997). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists (Virginia, USA: Method 734.01).
- Balois-Morales, R.; Colinas-León, M.T.; Peña-Valdivia, C.B.; Chávez-Franco, S. H.; Alia-Tejagal, I. 2007. Sistema de estrés oxidativo, fenoles-polifenol oxidasa-peroxidasa, de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados con frío. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, **13(2)**: 115-120.
- Benavente-García, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuño, A.; Del rio, J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, **68**: 457-462.
- Benelli, L.; Souza, C.R.F.; Oliveira, W.P. 2013. Spouted bed performance on drying of an aromatic plant extract. *Powder Technology*, **239**: 59-71.
- Benzie, I. F. F.; Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**:70-76.
- 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**: 497-504.
- Bouaziz, M.; Fki, L.; Jemai, H.; Ayadi, M.; Sayadi, S. 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from *Chemlali* olive leaves. *Food Chemistry*, **108**: 253-262.
- Dekanski, D.; Ristic, S.; Radonjic, N.; Petronijevic, N.; Dekanski, A.; Mitrovic, D. 2011. Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidative changes in rat liver. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **76**: 1207-1218.

- Di Scala, K.C.; Crapiste, G.H. 2008. Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. *LWT- Food Science and Technology*, **41(5)**: 789-795.
- Dorta, E.; Lobo, M.G.; González, M. 2012. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *Food Science and Technology*, **45**: 261-268.
- Erbay, Z.; Icier, F. 2010. Thin-layer drying behaviors of olive leaves (*Olea europaea* L.) *Journal of Food Process Engineering*, **33 (2)**: 287-308.
- Fang, Z.; Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, **129(3)**: 1139-1147.
- Flores, F.P.; Singh, R.K.; Kong, F. 2014. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering*, **137**: 1-6.
- Genin, N.; Reneé, F. 1995. Analyse du Rôle de la transition vitreuse dans les procédés de conservation agroalimentaires. *Journal of Food Engineering*, **26**: 391-408.
- Gonnissen, Y.; Gonçalves, S.I.V.; De Geest, B.G.; Remon, J.P.; Vervaet, C. 2008. Process design applied to optimize a directly compressible powder produced via a continuous manufacturing process. *European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, **68**: 760-770.
- Hossain, M.B.; Barry-Ryan, C.; Martin-Diana, A.B.; Brunton, N.P. 2010. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry*, **123**: 85-91.
- Japón-Luján, R.; Luque de Castro, M.D. 2007. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, **2**: 185-191.
- Kouhila, M.; Kechaou, N.; Otmani, N.; Fliyou, M.; Lahsasni, S. 2002. Experimental study of sorption isotherms and drying kinetics of Moroccan *Eucalyptus globulus*. *Drying Technology*, **20(10)**: 2027-2039.
- Lewicki, P.P. 2006. Design of hot air drying for better foods. *Trends in Food Science and Technology*, **17**: 153-163.
- Markin, D.; Duek, L.; Berdicevsky, L. 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*, **46**: 132-136.
- Meterc, D.; Petermann, M.; Weidner, E. 2008. Drying of aqueous green tea extracts using a supercritical fluid spray process. *The Journal of Supercritical Fluids*, **45**: 253-259.
- Nicoli, M.C.; Anese, M.; Parpinel, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, **10(3)**: 94-100.
- Ortega-García, F.; Blanco, S.; Peinado, M.A.; Peragón, J. 2008. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiology*, **28(1)**: 45-54.
- Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 3396-3402.
- Raederstorff, D. 2009. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **79**: 152-165.
- Raguse, C.A.; Smith, D. 1965. Carbohydrate content in alfalfa herbage as influenced by methods of drying. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **13**: 306-309.
- Ranalli, A.; Gomes, T.; Delcuratolo, D.; Contento, S.; Lucera, L. 2003. Improving virgin olive oil quality by means of innovative extracting biotechnologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2597-2602.
- Ranalli, A.; Contento, S.; Lucera, L.; Di Febo, M.; Marchegiani, D.; Di Fonzo, V. 2006. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 434-440.
- Roche, H.M.; Gibney, M.J.; Kafatos, A.; Zampelas, A.; Williams, C.M. 2000. Beneficial properties of olive oil. *Food Research International*, **33(3-4)**: 227-231.
- Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Lavee, S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L.. *Scientia Horticulturae*, **92**: 147-176.

- Ryan, D.; Prenzler, P.D.; Lavee, S.; Antolovich, M.; Robards, K. 2003. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2532-2538.
- Siddhuraju, P. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT-Food Science and Technology*, **40(6)**: 982-990.
- Singleton, V.L.; Ortholer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**: 152-178.
- Souza, C.R.F.; Schiavetto, I.A.; Thomazini, F.C.F.; Oliveira, E.P. 2008. Processing of *Rosmarinus officinalis* linne extract on spray and spouted bed dryers. *Brazil Journal Chemical Engineerin*, **25(1)**: 59-69.
- Soysal, Y.; Öztekin, S. 2001. Technical and economic performance of a tray dryer for medicinal and aromatic plants. *Journal of Agricultural Engineering Research*, **79**: 73-79.
- Ungar, Y.; Osundahunsi, O.F.; Shimoni, E. 2003. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 4394-4399.
- Visioli, F.; Galli, C. 2002. Biological properties of olive oil phytochemicals biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **42**: 209-221.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Gritsanapan, W. 2013. Bioactive contents and free radical scavenging activity of *Moringa oleifera* leaf extract under different storage conditions. *Industrial Crops and Products*, **49**: 419-421.