

## **Production of extracts from preserved olives using supercritical CO<sub>2</sub> and preliminary evaluation of its polyphenol content**

*Obtenção de extractos de azeitona em conserva usando CO<sub>2</sub> supercrítico e avaliação preliminar do seu conteúdo em polifenóis*

**Maria João Cebola, Patrícia Rijo**

CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Campo Grande 376,  
1749-024, Lisboa, Portugal  
Email: m.joao.cebola@gmail.com

---

### **Abstract**

The supercritical fluid extraction (SFE) technique was used to obtain extracts from a sample simulating an olive pomace, obtained from preserved olives. The objective was to achieve the extraction of polyphenolic components from this matrix which is considered a hazardous waste from the production of olive oil. The supercritical fluid used was carbon dioxide and the SFE studies were conducted in two stages, the first at a pressure of 200 bar and 40 °C and the second stage at 300 bar, 45 °C and using ethanol as co-solvent. In both cases the SFE was performed for 3 hours. The first stage was carried out to obtain a cleaner matrix and the second step was aimed at the components of interest. The overall mass yield obtained was 5.5 %. Preliminary HPLC screening of the samples obtained and also of the water in which the olives were preserved showed that the polyphenol compounds were mostly in the latter.

**Keywords:** Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction, olive pomace, polyphenols

---

### **Resumo**

A técnica de Extração Supercrítica (ESC) foi usada para obter extractos de uma amostra, que pretendia simular o bagaço de azeitona, obtida de azeitonas em conserva. O objetivo era conseguir a extração de componentes polifenólicos desta matriz que é considerada um resíduo perigoso proveniente da produção de azeite. O fluido supercrítico usado foi o dióxido de carbono e os estudos de SFE foram realizados em duas fases: a primeira, a uma pressão de 200 bar e 40 ° C e a segunda a 300 bar, 45° C e usando etanol como co-solvente. Em ambos os casos, a SFE foi realizada durante 3 horas. A primeira fase foi realizada para obter uma matriz mais limpa e a segunda etapa tinha como alvo os componentes de interesse. O rendimento total em massa obtido foi de 5,5 %. O estudo preliminar, por HPLC, do perfil químico foi efectuado e o rastreio das amostras obtidas foi realizado, bem como o da água da conserva das azeitonas, e mostraram que os compostos polifenólicos estavam presentes principalmente neste último caso.

**Palavras-chave:** Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, bagaço de azeitona, polifenóis

Received / *Recebido*: 29/10/2013

Accepted / *Aceite*: 05/11/13

Electronic Edition: <http://www.biomedicalandbiopharmaceuticalresearch.com>

## Introduction

Olive pomace is a by-product of the olive oil industry, comprising the skin and pulp from the second mechanical pressing to which olives are submitted for the production of olive oil. It is considered a residue with very little commercial value, being used at the moment as fuel and/or manure. These uses do not represent real profit for the olive oil industry and therefore the pomace is looked upon as an undesirable by-product. However, several scientific studies have shown that this material is very rich in substances such as polyphenols which are of known pharmaceutical interest, due to their antioxidant, antibacterial and antimicrobial properties (1, 2). The objective of the present study is to assess the possibility of obtaining composts of commercial interest, so that an almost useless by-product could be made profitable. In order to obtain extracts in a more environmentally friendly way, the extraction procedures were performed by using the Supercritical Fluids Extraction (SFE) technique using supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>). The more conventional techniques for obtaining extracts from vegetal matrices, such as solvent extraction, have a number of disadvantages. They use considerable amounts of organic solvents, thus producing large quantities of toxic solvent waste, and are usually time-consuming. Furthermore, as they are often carried out at high temperatures, this may result in the degradation of the thermo-labile components. SFE is a technique that does not have these disadvantages and it also has the potential for selective extractions, by varying the pressure and temperature (3). What could be a drawback of SFE is the non-polarity of CO<sub>2</sub> which makes it difficult to extract more polar components. However, this difficulty is overcome by the use of a co-solvent to modify polarity of the solvent. Methanol is the solvent most commonly used as a modifier for several matrices (4). However, it is toxic and therefore ethanol is the preferable choice in SFE of natural products (5).

Phenolic compounds have been used for centuries as traditional treatments for many disorders. However, pre-clinical studies for assessing the pharmacognostical, phytochemical, toxic and biological properties of any herbal drug are absolutely essential before its clinical administration. In particular, the qualitative and quantitative analysis of the phenolic compounds found in any plant part following systematic scientific methodology and its comparison with standard phenolic compounds is very important for establishing its efficacy. (6).

## Materials and methods

### *Plant material*

The material used was not true olive pomace but rather a paste obtained from olives preserved in water for more than a year. The water in which they were preserved exhibited a dark colour which indicated that some degree of extraction had already taken place. For this reason,

## Introdução

O bagaço de azeitona é um subproduto da indústria do azeite, que inclui a pele e a polpa que resultam da segunda prensagem a que as azeitonas são submetidas para a produção de azeite. É considerado um resíduo com muito pouco valor comercial, estando a ser usado como combustível e/ou estrume. Dado que estes usos não representam lucro real para a indústria de azeite, o bagaço é encarado como um subproduto indesejado. No entanto, vários estudos científicos têm mostrado que este material é muito rico em substâncias com potencial interesse comercial como é o caso dos polifenóis, uma classe de substâncias bem conhecida pelas suas propriedades de interesse farmacêutico, como por exemplo a sua capacidade antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, entre outras (1, 2). O objetivo do presente estudo é avaliar a possibilidade de obtenção de compostos de interesse comercial, para que um subproduto quase inútil pudesse ser rentabilizado. A fim de obter extratos de uma forma mais ambientalmente correta, as extrações foram realizadas pela técnica de Extração Supercrítica (ESC). As técnicas mais convencionais de obtenção de extratos a partir de matrizes vegetais, são as de extração com solventes orgânicos que apresentam um número de desvantagens. Neste tipo de extração, geralmente demoradas, são usadas quantidades consideráveis de solventes orgânicos, produzindo grandes quantidades de resíduos tóxicos. Além disso, como são muitas vezes realizadas a altas temperaturas, pode ocorrer uma degradação dos componentes termo-lábeis. A SFE é uma técnica que não tem estas desvantagens e também tem o potencial para extrações seletivas, para tal bastando variar a pressão e a temperatura (3). Uma possível desvantagem da SFE é a não-polaridade do CO<sub>2</sub>, tornando difícil a extração de componentes polares. No entanto, essa dificuldade é superada pelo uso de um co-solvente que vai modificar a polaridade do solvente. O metanol é o solvente mais comumente usado como modificador para várias matrizes (4). No entanto, é tóxico e, portanto, o etanol é uma escolha preferível em SFE de produtos naturais (5).

## Materiais e Métodos

### *Material Vegetal*

O material vegetal utilizado não era verdadeiro bagaço de azeitona, mas antes uma pasta obtida a partir de azeitonas conservadas em água por mais de um ano. A água de conserva apresentava uma cor escura, indicando que algum grau de extração já teria tido lugar. Por esta razão,

the preserve water was also analyzed by HPLC. To simulate the pomace, the olives were de-stoned and ground in a food processor (A327R1, Moulinex, France). The paste thus obtained was then submitted to a process to remove most of its oil. To that end, the paste was kneaded for 45 min to 60 min in a water bath set at 30 °C, to attain fat separation. Next, the paste was centrifuged for 30 min to obtain a three phases separation of paste, water and oil. The water and oil were then separated, leaving the paste to be used for the extraction.

#### *Chemicals*

Carbon dioxide (N48-99.998 %) for extraction was supplied in cylinders by Air Liquide (Lisbon, Portugal). Absolute ethanol Ethanol absolute for analyse obtained from Merck (Darmstadt, Germany) was used as the co-solvent.

#### *Supercritical Fluid Extraction apparatus and procedure*

The SFE apparatus used to carry out the extraction assays has already been extensively described by Pereira *et al.* (7). In short, the apparatus includes a stainless steel extraction vessel with a capacity of 278 mL. Each extraction run was carried out at a fixed pressure, temperature and SC-CO<sub>2</sub> flow rate (0.4 kg/h), using 30 g of the olive paste. For the run with co-solvent, the ethanol flow rate was 90 g/h. The extraction was divided into two stages: the first was carried out at 200 bar, 40 °C to remove unwanted non-polar substances such as any remaining oil; the second was carried out at 300 bar, 45 °C and using ethanol as the co-solvent which targeted more polar substances such as polyphenols, hence the use of the modifier. Each stage lasted 3 hours.

There is always a degree of extract deposition along the tubing expansion line. To recover this extract, the line was always cleaned with ethanol after each extraction the extract was, therefore, collected in this solvent. The ethanol-free olive extract was obtained after evaporation using a rotary evaporator at a temperature of 35 °C.

#### *HPLC analysis*

The HPLC analysis was carried out in a Liquid Chromatograph Agilent Technologies 1200 Infinity Series equipped with a LiChrospher 100, RP-18 (5 µm, 250 mm × 4 mm i.d.), Merck, Germany. The extracts were analysed injecting 20 µL and using a gradient composed of solution A (0.3 % phosphoric acid), solution B (acetonitrile) and solution C (methanol) as follows: 0 min, 90 % A, 10 % B and 50 min 5 % A, 80 % B, 15 % C (8). The extracts and standards were run under the same conditions, for 30 minutes run time using 1 mg/mL solutions in methanol and the detection was carried

a água da conserva também foi analisada por HPLC. Para simular o bagaço, as azeitonas foram descaroçadas e moídas num processador de alimentos (A327R1, Moulinex, França). A pasta, assim obtida, foi então submetida a um processo de remoção da maior parte do óleo nela presente. Para isso, a pasta foi amassada durante 45 minutos a 60 minutos em banho Maria, a 30 °C, de modo a obter-se a separação da gordura. Em seguida, a pasta foi centrifugada durante 30 minutos até ocorrer a separação das três fases, pasta, água e óleo. A água e o óleo foram, em seguida, separados da pasta que foi posteriormente usada para a extração.

#### *Reagentes*

O dióxido de carbono (N48-99.998 %) utilizado na ESC foi fornecido pela Air Liquide (Lisboa, Portugal). Etanol absoluto p.a., da Merck (Darmstadt, Alemanha), foi usado como o co-solvente.

#### *Aparelho de Extracção Supercrítica e Procedimento*

O aparelho de ESC utilizado para realizar os ensaios de extração foi já descrito em detalhe por Pereira *et al.* (7). Sucintamente, o aparelho inclui uma célula de extração de aço inoxidável de 278 mL de capacidade. Cada ensaio de extração foi realizado a pressão, temperatura e a caudal de CO<sub>2</sub> supercrítico (0,4 kg/h) constantes, usando 30 g de pasta de azeitona. Para o ensaio com co-solvente, o caudal de etanol foi de 90 g/h. A extração foi dividida em duas fases. A primeira foi realizada a 200 bar e 40 °C, para remoção de compostos indesejados e de substâncias não-polares, tais como qualquer óleo restante. Uma segunda fase, realizada a 300 bar, 45 °C, utilizava o etanol como co-solvente, visando substâncias mais polares, como polifenóis, daí o uso do modificador. Cada fase teve uma duração de 3 horas. Há sempre um certo grau de deposição de extrato ao longo da tubagem que constitui a linha de expansão; para recuperar este extrato a linha foi sempre limpa com etanol, após cada extracção. O extrato foi, portanto, recolhido neste solvente. O extrato de azeitona, livre de etanol, foi obtido após evaporação usando um evaporador rotativo, a uma temperatura de 35 °C.

#### *Análise por HPLC*

A análise por HPLC foi realizada num Cromatógrafo Líquido Agilent Technologies da série 1200 equipado com uma coluna LiChrospher 100, RP-18 (5 µm, 250 mm × 4 mm i.d.), Merck, Alemanha. Os extratos foram analisados injectando 20 µL e utilizando um gradiente composto por uma solução de A (0,3 % de ácido fosfórico), solução B (acetonitrilo) e uma solução C (metanol) como se segue: 0 min 90 % de A, 10 % B e 50

out between 200 nm and 600 nm with a diode array detector. The UV detection was done at a wavelength of 270 nm using a 1.0 mL/min flow rate.

## Results

### SFE Yields

The SFE studies were performed in two stages which differed in the pressure and temperature conditions at which they were executed. The extract corresponding to the decompression step was recovered separately, so that masses of three extracts were recorded. The yields obtained are shown in table 1.

min 5 % A, 80 % B, 15 % C (8). Os extractos e padrões foram analisados num tempo de eluição de 30 minutos usando soluções de 1 mg / mL em metanol e a detecção foi realizada entre 200 nm e 600 nm com um detector de fotodiodos. A detecção por UV foi efectuada ao comprimento de onda de 270 nm, utilizando um fluxo de 1,0 mL / min.

## Resultados

### Rendimento da ESC

Os estudos de ESC foram realizados em duas fases, que diferem entre si nas condições de pressão e temperatura às quais foram executados. O extrato correspondente à etapa de decompressão foi recuperado separadamente, pelo que foram obtidas massas referentes a três extractos. Os rendimentos obtidos encontram-se na tabela 1.

**Table 1 / Tabela 1:** Extraction yields obtained for the olive bagasse-like sample  
Rendimentos das extracções da amostra que simula o bagaço de azeitona.

ESC Run	P / bar	T / °C	Co-Solvent	$\eta$ / %
1	200	40	No	1.14
2	300	45	Ethanol	2.81
3	Decompression	45		1.56
<b>TOTAL</b>				<b>5.51</b>

### HPLC Analysis

The HPLC profile of the 3 extracts, obtained using the method described above, revealed a similar pattern of elution (see Figure 1). However, the chromatogram for the sample of the water in which the olives were preserved showed a different profile (see Figure 2). Chromatograms of eighteen polyphenolic compounds standards, i.e., gallic acid (3.7 min), catechin (6.2 min), protocatechuic acid (6.3 min), tyrosol (6.7 min), chlorogenic acid (6.8 min), *p*-hydroxybenzoic acid (7.9 min), epicatechin (8.0 min), vanillic acid (8.4 min), caffeic acid (8.5 min), vanillin (9.4), coumaric acid (10.5 min), naringin (11.9 min), ferulic acid (12.3 min), quercetin-3-glucoside (12.4 min), rosmarinic acid (12.4 min), oleuropein (12.5 min), kaempferol-3-ramnoglucoside (13.8 min), quercetin (16.7 min) and kaempferol (17.8 min), having the retention times mentioned above, were obtained using the same HPLC method conditions of the extracts. The comparison of extracts and standards revealed that the water extract showed retention peaks that exhibited more similarities with the polyphenol compound chromatograms. Further studies will make it

### Análise por HPLC

O perfil de HPLC dos 3 extractos da ESC revelou um padrão de eluição semelhante (ver Figura 1). No entanto, o cromatograma para a amostra da água de conserva das azeitonas apresentou um perfil diferente ( ver Figura 2). Os cromatogramas de padrões de dezoito compostos polifenólicos, o ácido gálico (3,7 min), a catequina (6,2 min), o ácido protocatecuico (6,3 min), o tirosol (6,7 min), o ácido clorogénico (6,8 min), o ácido *p*- hidroxibenzóico (7,9 min), a epicatequina (8,0 min), o ácido vanílico (8,4 min), o ácido cafeico (8,5 min), a vanilina (9,4 min), o ácido cumárico (10,5 min), a naringina (11,9 min), o ácido ferúlico (12,3 min), a quercetina -3- glucosídeo - rutina (12,4 min), a oleuropeína (12,5 min), o ácido rosmarínico (12,4 min), o campferol -3- ramnoglucosídeo (13,8 min ), a quercetina (16, min) e o campferol (17,8 min), tendo os tempos de retenção mencionados acima, foram obtidos utilizando as mesmas condições do método de HPLC dos extractos. A comparação dos cromatogramas dos extractos e dos padrões revelou que o extracto aquoso mostrou picos de retenção que apresentaram mais semelhanças com os



To thank Marisa Nicolai and Filipe Pereira, from Research Centre for Biosciences and Health Technologies (CBiOS), for their assistance with the HPLC analysis.

### **Conflict of Interests**

The authors declare that there are no financial and / or personal relations that could be viewed as a potential conflict of interests.

A Marisa Nicolai e Filipe Pereira, do Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde (CBiOS), pela sua colaboração na análise por HPLC.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não existem relações financeiras ou pessoais que puderam ser vistas como um potencial conflito de interesses.

## References / Referências

1. Lama-Muñoz A., Rodríguez-Gutiérrez G., Rubio-Senent F., Palacio-Díaz R., Fernández-Bolaños J., A study of the precursors of the natural antioxidant phenol 3,4-dihydroxyphenylglycol in olive oil waste, *Food Chemistry*, 2013, 140, 154-160.
2. Aliakbarian B., Palmieri D., Casazza A. A., Palombo D., Perego P., Antioxidant activity and biological evaluation of olive pomace extract, *Natural Product Research*, 2012, 26, 2280-2290.
3. Ghasemi E., Raofie F., Najafi N.M., Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves, *Food Chemistry*, 2010, 126, 1449-1453.
4. Lang Q., Wai C. M., Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review, *Talanta*, (2001), 53, 771-782.
5. Pereira C. G., Meireles M. A. A., Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives, *Food Bioprocess Technology*, 2010, 3, 340-372.
6. Mradu G., Saumyakanti S., Sohini M., Arup M., HPLC Profiles of Standard Phenolic Compounds Present in Medicinal Plants, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2012, 4 162-167.
7. Pereira P., Bernardo-Gil M. G., Cebola M. J., Mauricio E., Romano A., Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization, *J. Supercrit. Fluids*, 2013, 83, 57-64.
8. Falé P. L., Borges C., Amorim Madeira P. J., Ascensão L., Araújo M. E. M, Florêncio M. H., Serralheiro M. L. M., Rosmarinic acid, scutellarein 40-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"), *Food Chemistry*, 2009, 114798-805.