

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE NUTRIÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



**DISSERTAÇÃO**

**Folhas de Oliveira (*Olea europaea* L): Composição em Bioativos,  
Atividades Antioxidante e Biológica**

**Bruna da Fonseca Antunes  
Engenheira de Alimentos**

**Pelotas, 2018.**

**Bruna da Fonseca Antunes**

**Folhas de Oliveira (*Olea europaea* L): Composição em Bioativos,  
Atividades Antioxidante e Biológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andressa Carolina Jacques

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A636f Antunes, Bruna da Fonseca

Folhas de oliveira (*Olea europaea* L) : composição em bioativos, atividades antioxidante e biológica / Bruna da Fonseca Antunes ; Rui Carlos Zambiasi, orientador ; Andressa Carolina Jacques, coorientadora. — Pelotas, 2018.  
90 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Oliveira. 2. Resíduo agroindustrial. 3. Compostos bioativos. 4. Estresse oxidativo. 5. Ratos wistar. I. Zambiasi, Rui Carlos, orient. II. Jacques, Andressa Carolina, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Aline Herbstrith Batista CRB: 10/1737

Bruna da Fonseca Antunes

Folhas de Oliveira (*Olea europaea* L): Composição em Bioativos, Atividades Antioxidante e Biológica

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28 de fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

Rui Carlos Zambiasi

Prof. Dr. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, UFPel (Orientador)

Doutor em Food and Nutritional Science pela University of Manitoba, U.M., Canadá

Deborah Murowaniecki Otero

Pós-Doutoranda pela Universidade Federal de Pelotas, UFPel

Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande, FURG

Eliezer Avila Gandra

Prof. Dr. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, UFPel

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas, UFPel

Dedico este trabalho a quem sempre esteve presente, por ter possibilitado  
tamanho oportunidade e pelo apoio que sempre me deu tornando este  
momento possível, minha mãe Eunice.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, que me conduziu durante esses dois anos para que eu pudesse ter sabedoria, paciência e serenidade para enfrentar as adversidades ao longo do tempo.

Aos meus pais Argeni e Eunice, pelo amor incondicional, apoio, dedicação, pelo esforço para que eu pudesse chegar até aqui, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me ajudar a torna-los realidade. Amo vocês!

Ao meu irmão Rodrigo, por estar sempre ao meu lado, pela alegria e cumplicidade. Te amo!

À minha amada sobrinha Camile, tão pequena e repleta de força. Minha parceirinha de todas as horas, obrigada por existir e fazer parte da minha vida. Te amo muito bicoitinho!

À minha cunhada e amiga Aline, pelo companheirismo em todos os momentos e por não me deixar desanimar diante das dificuldades encontradas durante a realização deste trabalho. Te amo!

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi, pela orientação. Ao senhor que é um exemplo de profissional ético e gentil, agradeço pela paciência e confiança.

À minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Andressa Carolina Jacques pela valiosa ajuda, dedicação, pela amizade, apoio, exemplo de profissional, que admiro desde a graduação.

Aos colegas de laboratório: Alexandre Lorini, Bruna Maas, Cristina Jansen, Deborah Otero, Fernanda Krumreich, Karina Fernandes, Lorena Aguiar e Michele Crizel, pela convivência, a qual permitiu que os dias de trabalho se passassem entre conversas, guloseimas, chimarrão, músicas, conselhos e piadas, e que desta forma ou pelas sugestões e troca de experiências contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas bagequínas: Cristielle de Leon, Fernanda Oliveira, Raquel Oliveira e Valeska Roque. A Cristielle pela amizade, pelos momentos de descontração, pela tua alegria contagiante e ajuda em todas as horas, por ter assumido o ensaio biológico com tanta boa vontade no momento em que não pude estar presente. Muito obrigada amiga! A Fernanda pela amizade e

companheirismo, pelos diversos dias de ajuda no laboratório, neste trabalho há muito de ti! Obrigada pelo teu apoio em todos os momentos da minha vida, pela tua generosidade e por dar ouvidos as minhas reclamações e estresses. Obrigada Fê Diva! A Raquel pela amizade e companheirismo desde o tempo da “Unipampa”, obrigada pela paciência, motivação e por sempre ter uma palavra amiga. Obrigada miga! A Valeska, minha parceira de viagem, de casa, risadas. Obrigada pela amizade e companheirismo, pelas muitas caronas, almoços e jantas, todos regados com muito bom humor. Obrigada miga!

Aos professores, Anderson Ribeiro, Eliezer Gandra e Elizabete Helbig, por terem cedido do seu tempo e atenção, seja para o uso do laboratório, equipamentos ou do seu conhecimento sobre as inúmeras análises que eu fiz.

Ao pessoal da Estância Guarda Velha, que muito gentis me concederam as amostras para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. À Capes, pelo auxílio financeiro.

À todos, Muito Obrigada!

*"Quem só acredita no visível tem um mundo muito  
pequeno".*

*Caio Fernando Abreu*



## RESUMO

ANTUNES, Bruna da Fonseca. **Folhas de Oliveira (*Olea europaea* L): Composição em Bioativos, Atividades Antioxidante e Biológica**. 2018. 90f. Projeto de Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A Oliveira (*Olea europaea* L.) é pertencente à família botânica *Oleaceae*, sendo considerada uma das frutíferas mais antigas cultivadas pelo homem. As folhas da oliveira são normalmente descartadas durante o processo de produção da azeitona, e portanto, ainda pouco exploradas. Porém, são atribuídas as folhas vários efeitos benéficos para a saúde, principalmente devido ao conteúdo de compostos com atividades bioativas. Afim de valorizar as características nutricionais e bioativas este estudo foi dividido em dois experimentos, e teve como objetivo realizar a caracterização físico-química, quantificar os compostos bioativos, assim como avaliar o potencial biológico das folhas de oliveira. Foi determinada a composição proximal, pH, acidez titulável, conteúdo em minerais, compostos bioativos, compostos fenólicos individuais, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e avaliação do efeito na glicemia, perfil lipídico e na peroxidação lipídica de extrato aquoso de folhas de oliveira em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. As folhas de oliveira apresentaram alto teor de fibras e de proteínas, e os minerais predominantes foram o potássio e o cálcio. Um alto conteúdo de compostos bioativos foi encontrado, sendo os flavonoides, carotenoides, rutina e campferol, apresentando um maior conteúdo. As folhas de oliveira apresentaram uma alta atividade antioxidante e potencial antibacteriano frente a *E. coli* e *S. aureus*. Foram encontradas diferenças no conteúdo das folhas, na caracterização físico-química e proximal, bem como na quantificação de compostos bioativos, atividade antioxidante e antimicrobiana dentre as diferentes cultivares estudadas. O consumo de extrato de folhas de oliveira pelos ratos promoveu alterações no perfil lipídico e efeito benéfico em relação aos níveis de TBARS. Devido a sua composição química rica em nutrientes e compostos com propriedade bioativas, além de suas consideráveis atividades antioxidante e biológica, as folhas de oliveira, podem vir a ser uma opção como suplemento alimentar.

**Palavras-chave:** oliveira; resíduo agroindustrial; compostos bioativos; estresse oxidativo; ratos Wistar

## ABSTRACT

ANTUNES, Bruna da Fonseca. **Folhas de Oliveira (*Olea europaea* L): Atividades Antioxidante, Antimicrobiana e Biológica**. 2018. 89. Projeto de Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Oliveira (*Olea europaea* L.) belongs to the botanical family Oleaceae, being one of the oldest fruit grown by man. The olive leaves are usually discarded during the olive production process, and therefore, they are still little explored. However, it is attributed to them beneficial health effects, mainly due to the presence of compounds with bioactive activities. In order to valorize its nutritional and bioactive characteristics, a complete characterization is necessary. This study was divided in two experiments, and had as objective the physicochemical evaluation and bioactive compounds content, as well as the biological evaluation of the olive leaves. It was determined the proximal composition, pH, titratable acidity, minerals, bioactive compounds, individual phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, glycemia evaluation, lipid profile and lipid peroxidation of aqueous extracts of olive leaves in rats fed with hyperlipidic diets. Olive leaves are high in fiber and protein, with potassium and calcium as the major minerals. A high content of bioactive compounds was found, being the flavonoids, carotenoids, rutin and campherol the major ones. Olive leaves showed antioxidant activity and potential against bacterial *E. coli* and *S. aureus*. Differences were found in the leaves from different cultivars, in the physico-chemical and proximal characterization, as well as in the bioactive compounds content, antioxidant and antimicrobial activity. The consumption of olive leaf extract by rats promoted changes in the lipid profile and a beneficial effect in relation to TBARS levels. Due to their composition, antioxidant and biological properties, olive leaves may prove to be an option as a food supplement.

**Keywords:** olive tree; agroindustrial waste; bioactive compounds; oxidative stress; Wistar rats

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Oliveiras com idade de: a) 3 anos e b) 600 anos.....	5
Figura 2 - Cultivares de azeitonas: a) Arbequina, b) Koroneiki, c) Frantoio, d) Arbosana, e) Manzanilha .....	8
Figura 3 - Estrutura básica dos flavonóides. ....	10
Figura 4 - Estrutura química: a) Oleuropeína e b) Hidroxitirosol. ....	11
Figura 5 - Estruturas de taninos hidrolisáveis.....	12
Figura 6 - Fórmulas estruturais: a) um flavanóide genérico, b) flavan-3-ol e c) tanino condensado. ....	12
Figura 7 -Estrutura química da Chl 'a' e Chl 'b'. ....	14
Figura 8 - Estrutura química: a) $\beta$ -caroteno e b) Licopeno. ....	15
Figura 9 - Estrutura química: a) Luteína, b) Zeaxantina e c) Astaxantina. ....	16
Figura 10 - Ganho de peso de ratos Wistar durante o experimento.....	51
Figura 11 - Índice de peroxidação lípidica do coração, fígado e rins de ratos Wistar. ....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dietas Experimentais. ....	32
Tabela 2 - Resultados das análises físico-químicas das folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016. ....	34
Tabela 3 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método de determinação de minerais .....	36
Tabela 4 - Conteúdo de minerais nas folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016. ....	37
Tabela 5 - Conteúdos de compostos bioativos das folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016. ....	38
Tabela 6 - Conteúdo de compostos fenólicos individuais presentes nas folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016. ....	42
Tabela 7 - Valores da atividade antioxidante das folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016, avaliados pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS. ....	43
Tabela 8 - Halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão por aplicação de extratos de folhas de oliveira frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	46
Tabela 9 - Concentração inibitória mínima dos extratos de folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	47
Tabela 10 - Concentração bactericida mínima os extratos de folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> . ....	48
Tabela 11 - Consumo total de ração, água e extrato de folhas de oliveira durante o experimento com ratos Wistar. ....	50
Tabela 12 - Peso dos órgãos dos animais .....	52
Tabela 13 - Glicose dos animais. ....	53
Tabela 14 - Perfil lipidico dos animais. ....	55

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 OLIVEIRA: ORIGEM E CULTIVO .....	4
2.1.1 SOLO .....	5
2.1.2 CLIMA .....	5
2.2 CULTIVARES DE OLIVEIRAS.....	6
2.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FOLHA DE OLIVEIRA.....	8
2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE OLIVEIRA .....	9
2.4.1 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	10
2.4.2 CLOROFILAS.....	13
2.4.3 CAROTENOIDES.....	14
2.5 FOLHAS DE OLIVEIRA: BENEFÍCIOS E APLICAÇÕES.....	16
3 OBJETIVOS .....	19
3.1 OBJETIVO GERAL .....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	20
4.2 EXPERIMENTOS.....	20
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	20
4.3.1 DETERMINAÇÃO DO PH .....	20
4.3.2 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL .....	21
4.3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE.....	21
4.3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS .....	21
4.3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS .....	21

4.3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS.....	21
4.3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FIBRAS .....	22
4.3.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBOIDRATOS.....	22
4.4 MINERAIS .....	22
4.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS .....	22
4.5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	22
4.5.2 FLAVONOIDES.....	23
4.5.3 TANINOS .....	23
4.5.3.1 TANINOS CONDENSADOS .....	23
4.5.3.2 TANINOS HIDROLISADOS .....	24
4.5.4 CAROTENOIDES.....	24
4.5.5 TEOR DE CLOROFILAS.....	25
4.6 COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS (LC-MS).....	25
4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	27
4.7.1 PREPARO DO EXTRATO.....	27
4.7.2 DPPH· (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA) .....	27
4.7.3 FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER).....	28
4.7.4 ABTS (2,2'-AZINO-BIS (3-ETHYLBENZTHIAZOLINE-6-SULFONIC ACID)) .....	28
4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	29
4.8.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL.....	29
4.8.2 PREPARAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS.....	29
4.8.3 DISCO-DIFUSÃO .....	30
4.8.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	30
4.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>VERSUS</i> DIETAS HIPERLIPÍDICAS .....	31
4.9.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	32

4.9.1.1 GLICEMIA .....	32
4.9.1.2 PERFIL LIPÍDICO.....	32
4.9.1.3 ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	33
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROXIMAL .....	34
5.2 MINERAIS .....	36
5.3 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	38
5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS AVALIADOS POR LC-MS .....	41
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	43
5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	44
5.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>VERSUS</i> DIETAS HIPERLIPÍDICAS .....	49
5.7.1 CONSUMO ALIMENTAR, GANHO DE PESO, PESO DOS ORGÃOS ...	50
5.7.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	52
5.7.2.1 GLICOSE .....	52
5.7.2.2 PERFIL LIPIDICO.....	54
5.7.2.3 ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	56
6 CONCLUSÕES .....	59
REFERÊNCIAS.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A Oliveira (*Olea europaea L.*), pertencente à família botânica *Oleaceae*, é considerada uma das frutíferas mais antigas cultivadas pelo homem. A *Olea europaea L.* é a única espécie desta família que produz frutos comestíveis. Os frutos da oliveira servem como matéria-prima para a extração de azeite e para a produção de azeitona em conserva, ambos produtos muito apreciados pelos consumidores brasileiros (COUTINHO, 2007).

No Brasil, a cultura da oliveira foi introduzida em vários estados do país, sendo encontrada em maior proporção no Sul e Sudeste. Em 1948, essa cultura foi introduzida no Rio Grande do Sul a partir da criação do órgão especializado da Secretária da Agricultura (Serviço Oleícola). O pioneiro nesse cultivo foi a cidade de Uruguaiana, e desde então, o plantio foi intensificado por todo o estado gaúcho, onde foram implantados olivais às margens do Rio Jacuí e nos municípios de Arroio Grande, Pelotas e Rio Grande, entre outros. Atualmente, as principais áreas com plantios comerciais no Rio Grande do Sul encontram-se nas cidades de Bagé, Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Dom Pedrito, Encruzilhada do Sul, Santana do Livramento e Vacaria (COUTINHO, 2007).

Além da azeitona, a oliveira também produz grande quantidade de folhas, as quais são descartadas durante o ciclo de produção. As folhas contém quantidades apreciáveis de compostos fenólicos, dentre os quais se destaca a oleuropeína, à qual são atribuídas atividade antioxidante, antimicrobiana, hipoglicemiante, anti-inflamatória, dentre outras. Assim, devido à estas possíveis propriedades benéficas das folhas de oliveira, associado à necessidade de valorizar sua utilização, é importante o estudo do seu real valor biológico e do conteúdo de compostos bioativos. A exploração industrial das folhas pode representar uma opção de valoração ao plantio das oliveiras, em função do aumento da procura por produtos naturais por vários segmentos industriais, como alimentar e farmacêutico (FERNÁNDEZ-BOLAÑOS et al., 2006; GUINDA, 2006; ROIG et al., 2006).



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Oliveira: Origem e Cultivo

A oliveira é originária de regiões que se estendem desde o Sul do Cáucaso, Irã, Palestina até o Egito. Atualmente também é cultivada no Sul da África, Austrália, Europa, Japão e China. Na América, a produção de azeitonas teve início no México, Estados Unidos e Peru, e depois se estendeu para o Chile e Argentina. No Brasil esta cultura foi introduzida há vários séculos, nas regiões Sul e Sudeste. Em 1948, a cultura da oliveira foi introduzida no Rio Grande do Sul, mediante a criação do órgão especializado da Secretária da Agricultura, conhecido como Serviço Oleícola, cujo objetivo seria de orientar o cultivo e pesquisas com oliveiras. No entanto, por falta de planejamento e por razões políticas e econômicas, o programa não obteve êxito (COUTINHO, 2007).

A Embrapa Clima Temperado (Unidade Pelotas), no ano de 2005 desencadeou o projeto de pesquisa e desenvolvimento denominado *Introdução e Desempenho Agrônomo de Cultivares de Oliveira no Rio Grande do Sul e Santa Catarina*. A partir de então, este órgão de pesquisa passou a ser o responsável por fornecer suporte técnico aos olivais implantados e aos que serão implantados nestas regiões; além de investir na melhora da qualidade dos frutos produzidos (BERTONCINI; TERAMOTO; PRELA-PANTANO, 2010).

A oliveira, pertencente à família *Oleaceae*, é uma árvore de formato arredondado e de tamanho médio; a cor do tronco e a densidade da copa são diferenciadas de acordo com as condições de cultivo e do cultivar (Figura 1). No período juvenil, a planta apresenta folhas mais curtas e grossas e os ramos com entrenós de menor comprimento. No período adulto, as folhas apresentam estrutura maior e mais delgada, e o comprimento dos entrenós dos ramos ficam maiores (OLIVEIRA, 2006).

As flores da oliveira são pequenas e actinomorfas, ou seja, apresentam simetria, podendo ser subdividida em várias partes iguais. Em cada inflorescência, dependendo do cultivar, apresenta de 10 a 14 flores. Essas flores são subdivididas em dois tipos, as perfeitas, que são as hermafroditas; e as imperfeitas, referentes às masculinas, que não originam fruto (RODRIGUES; CORREIA, 2009).

As raízes destas plantas atingem entre 15 a 20 cm de profundidade, podendo chegar até 80 cm, e apresentam ramificações laterais, podendo se ligar com outras raízes de oliveiras existentes nas proximidades (RODRIGUES; CORREIA, 2009).

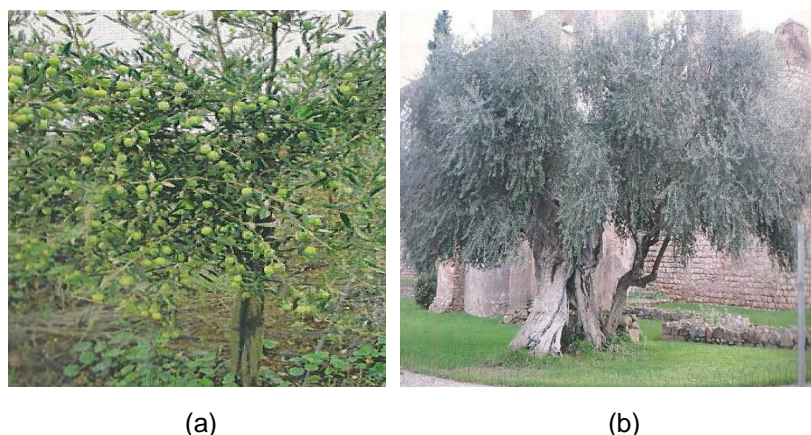


Figura 1 - Oliveiras com idade de: a) 3 anos e b) 600 anos  
Fonte: COUTINHO, 2007.

### 2.1.1 Solo

O solo para cultivo das oliveiras, segundo Oliveira (2006), deve apresentar pH entre 5,5 e 6,5, textura média (franco, franco-arenosa, franco-argilosa, argilo-arenosa e franco-argilo-arenosa) e ser bem drenado. Um dos maiores limitadores do desenvolvimento da oliveira é a umidade excessiva do solo, a qual deve ficar entre 60 a 80% (COUTINHO; JORGE, 2007).

Para Escobar (1994), fatores de grande influência no solo são as concentrações e tipos de nutrientes existentes, dentre os quais os de maior destaque são: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, zinco, enxofre e boro. No município de Caçapava do Sul, cidade com a maior área plantada, a oliveira está sendo cultivada em solos caracterizados como argissolos, neossolos, nitossolos e lactossolos (STRECK et al., 2008).

### 2.1.2 Clima

A oliveira é cultivada em regiões com elevadas temperaturas e baixo índice pluviométrico, normalmente em regiões semi-áridas do Mediterrâneo, como Espanha, Grécia, Itália, Marrocos e Portugal; e também em regiões com invernos rigorosos, sendo que nessas regiões o frio é indispensável para que a

oliveira, quando chegada à primavera desperte da dormência e ocorra a florescência. As espécies frutíferas cultivadas no Brasil são sensíveis ao frio; porém, gradualmente aumenta sua tolerância ao frio, devido às temperaturas baixas do outono, chegando a suportar temperaturas próximas a 0°C (COUTINHO; JORGE, 2007).

De acordo com estudos de plantio nos países do Mediterrâneo, a temperatura adequada para que ocorra a frutificação efetiva deve ficar na faixa de 25 a 30°C. As plantas, contudo, são capazes de suportar temperaturas próximas a 40°C, sem que os ramos e folhas sofram injúrias pelo calor. Porém, a atividade fotossintética começa a ser inibida quando a temperatura ultrapassa os 35°C (NAVARRO; PARRA, 2008).

Segundo Coutinho e Jorge (2007), a oliveira necessita de uma quantidade de água de 650 a 800 mm por ano. No entanto, no período de florescimento, na pré-maturação e na maturação dos frutos, que ocorre entre o final do verão e início do outono, as chuvas não devem ser muito intensas para o fruto não ficar aguado além do desejado; além de ocasionar o aumento do custo e uma extração mais lenta do azeite.

As regiões consideradas como as melhores para o plantio de oliveiras no Estado do Rio Grande do Sul são a Oeste e a metade Sul, onde a umidade relativa do ar é menor, principalmente na fase de florescimento, o que favorece a produção de frutos (COUTINHO; JORGE, 2007).

## **2.2 Cultivares de Oliveiras**

Existem diversas cultivares de oliveiras que produzem azeitonas com diferentes tamanhos, formas, firmeza, relação polpa/caroço e facilidade de desprendimento da polpa do caroço. Algumas cultivares são indicadas para a produção de azeite e outras para a produção de azeitonas de mesa, podendo ainda ter cultivares com dupla aptidão. As cultivares encontradas no RS, conforme citados por Coutinho, Jorge e Costa (2007), são Arbequina, Picual, Koroneiki, Frantoio, Arbosana, Coratina, Ascolana, Manzanilla, Leccino e Hojiblanca. As folhas de oliveira utilizadas no presente estudo foram das cultivares Arbequina, Koroneiki, Frantoio, Arbosana e Manzanilha (Figura 2).

**Arbequina:** Cultivar oriunda de Arbeca, na Catalunha/Espanha. É uma das variedades mais apreciadas; apresenta elevada produtividade, bom rendimento em óleo e excelente qualidade do azeite produzido. O fruto (Figura 2a) apresenta tamanho pequeno e peso < 2 g; porém, permite grande extração de óleo (entre 16 a 18%), o qual é aromático, frutado e fresco, com toques herbáceos.

**Koroneiki :** A cultivar é originária da Grécia, possui tamanho pequeno (<2 g) e elevado conteúdo de azeite (Figura 2b). Como a maturação desta cultivar é rápida, esse tipo de azeitona pode ser utilizado em plantações superintensivas, onde o período entre o plantio até a colheita é menor. Apresenta resistência à seca; porém, é susceptível ao frio. Possui alta produtividade, além de bom rendimento em óleo (> 22%) e azeite de qualidade do azeite devido ao alto teor de polifenóis.

**Frantoio:** Esta oliveira possui origem italiana, com capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo. Possui constante e elevada produtividade. Os frutos (Figura 2c) apresentam tamanho médio, peso entre 2-4g, e quantidade de óleo em torno de 23%. O azeite apresenta características sensoriais bastante apreciadas.

**Arbosana:** Cultivar de origem espanhola, os frutos apresentam tamanho pequeno com peso < 2 g, cor violeta na maturação e ligeiramente assimétrico (Figura 2d). A sua produção é constante e elevada, a época de maturação é tardia, sendo tolerante ao frio, com rendimento graxo de aproximadamente 20%.

**Manzanilla:** É a cultivar de oliveira mais difundida e apreciada, devido a sua alta produtividade e qualidade dos frutos, sendo de origem espanhola. Apresenta porte reduzido e se adapta ao cultivo intensivo. É susceptível ao frio e a separação entre polpa e caroço é realizada facilmente. Apresenta em torno de 16% de óleo, e é mais utilizada para a produção de azeitona em conserva.

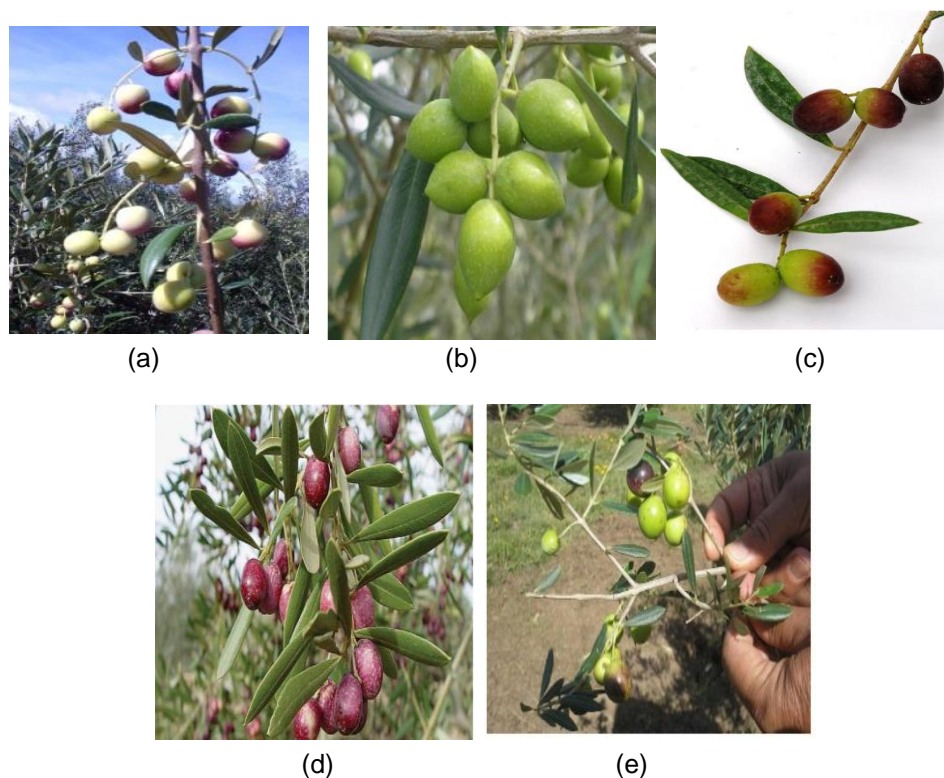


Figura 2 - Cultivares de azeitonas: a) Arbequina, b) Koroneiki, c) Frantoio, d) Arbosana, e) Manzanilha  
 Fonte: COUTINHO, 2007.

### 2.3 Caracterização Química da Folha de Oliveira

A composição das folhas de oliveira segundo Nogueira (2012) pode variar dependendo de fatores como cultivar, clima, solo, regime de irrigação, e estado de desenvolvimento da planta.

Em estudos realizados por Pacetta (2007), o qual analisou folhas de oliveira de vários cultivares provenientes de um sistema de cultivo totalmente orgânico e sem utilização de agrotóxicos (localizado no estado de São Paulo), encontrou-se valores para umidade - 7,6%, cinzas - 7,5%, lipídios - 3,1%, proteínas - 10,8%, fibra alimentar total - 50,3% e carboidratos - 20,7%. Fica evidente que a folha da oliveira é rica em fibra alimentar, podendo ser utilizada na formulação de vários produtos como uma possível fonte de fibras, as quais auxiliam na regulação do trânsito intestinal, proporcionam sensação de saciedade, além de possuir capacidade de interferir na absorção de açúcares e gorduras, sendo desta forma uma ferramenta importante para o controle do peso, colesterol e triglicerídeos (BERNAUD; RODRIGUES, 2013).

De acordo com Cavalheiro et al. (2014), os quais analisaram folhas de oliveira da cultivar Arbequina colhidas na cidade de Caçapava do Sul/RS, encontraram valores de umidade - 58,7%, cinzas - 4,9%, proteínas - 12,3%, lipídios - 8,2% e carboidratos - 9,6%. Ainda são encontrados nas folhas de oliveira minerais como: cobre, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, zinco, cádmio, cobalto, níquel, crômio, selênio, alumínio, ferro e cálcio. As cultivares em geral apresentam em maior quantidade potássio ( $11.110 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), seguido do magnésio ( $1.782 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e fósforo ( $1.341 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). As folhas da cultivar Arbequina em específico, apresenta em maior quantidade: potássio ( $11.448 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ ), cálcio ( $10.780 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e enxofre ( $2462 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Assim, as folhas de oliveira, se consumidas em quantidades adequadas, poderiam ser fontes importantes de alguns elementos classificados pela Organização Mundial da Saúde como essenciais para a saúde, como o Ferro, Cálcio, Magnésio, Zinco e Manganês (FAO/OMS, 2001).

#### **2.4 Compostos Bioativos e Capacidade Antioxidante das folhas de oliveira**

Segundo a Resolução RDC nº. 2, de 07 de janeiro de 2002, os compostos bioativos compreendem, além dos nutrientes, substâncias não-nutrientes, que possuem ação metabólica ou fisiológica específica (BRASIL, 2002).

Estudos constataram que o conteúdo de compostos bioativos está fortemente correlacionado com a capacidade antioxidante, que por sua vez esta relacionada com o retardo do envelhecimento e a prevenção de varias doenças, devido as suas propriedades de reagir com os radicais livres, protegendo os tecidos do organismo humano contra o estresse oxidativo e patologias associadas (TAPIERO et al., 2002; CANUTO et al. 2010).

Dentre os compostos bioativos destacam-se os carotenoides, compostos fenólicos, antocianinas, ácido ascórbico e tocoferóis, os quais estão associados a diversos benefícios à saúde e à proteção do corpo humano contra diferentes doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, *diabetes mellitus*, dislipidemias, hepatopatias e cânceres (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; DEMBITSKY et al., 2011; DEVALARAJA; JAIN; YADAV, 2011).

### 2.4.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são oriundos do metabolismo secundário das plantas, que se formam em condições de estresse como: infecções, ferimentos, radiações UV, entre outros; e são essenciais para o crescimento e reprodução da planta (NACZK; SHAHIDI, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O teor desses compostos nos vegetais pode variar conforme a região de plantio, tipo de solo, exposição solar, índice pluviométrico, estágio de maturação, espécie e cultivar (VENDRAMINI; TRUGO, 2004; MARTINS et al., 2011). Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela cor, amargor, adstringência e aroma (PELEG; BODINE; NOBLE, 1998), além de conferir certa estabilidade oxidativa aos produtos de origem vegetal (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos presentes nas plantas são classificados em: flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides (Figura 3), também conhecidos como polifenóis, geralmente ocorrem nas plantas em forma de glicosídeos, sendo uma das classes de substâncias responsáveis pela atribuição do perfil sensorial, bem como a atribuição do “corpo” característico (FENNEMA, 1993; BOBBIO; BOBBIO, 2001; AHERNE; O'BRIEN, 2002; SLUIS et al., 2001; CORDENUNSI et al., 2002).

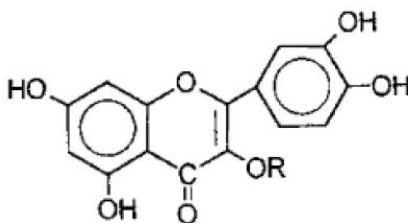


Figura 3 - Estrutura básica dos flavonóides.  
Fonte: SKERGET et al., 2005.

Folhas de oliveira das cultivares Arbequina e Frantoio, apresentam uma concentração de compostos fenólicos que varia entre 30,2 a 236,20 mg de ácido gálico.g<sup>-1</sup> em base seca (CAVALHEIRO et al., 2014; GOLDSMITH et al., 2015).

Dentre os flavonoides presentes nas folhas de oliveira, destaca-se a oleuropeína e o hidroxitirossol. O elevado consumo de produtos à base de oliveira na dieta mediterrânea, por exemplo, relaciona-se com menor incidência de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, sendo que as

características antioxidantes dos flavonóides hidroxitirosol e oleuropeína foram relacionadas aos benefícios relatados e à elevada estabilidade deste óleo (VISIOLI et al., 2002).

A oleuropeína é o polifenol mais abundante na folha de oliveira, com conteúdo de 60 a 90 mg.g<sup>-1</sup> em base seca (LE TUTOUR; GUEDON, 1992), este polifenol é responsável pelo amargor dos frutos. Ao longo da maturação ou processamento do azeite ocorre a oxidação e a hidrólise da oleuropeína, ocorrendo a formação do hidroxitirosol (Figura 4), o qual é considerado um importante antioxidante do azeite de oliva. Portanto, a oleuropeína está presente em quantidades mais elevadas no fruto e nas folhas de oliveira, enquanto que o hidroxitirosol é mais abundante no fruto processado e no azeite de oliva (PEDROSA, 2010).

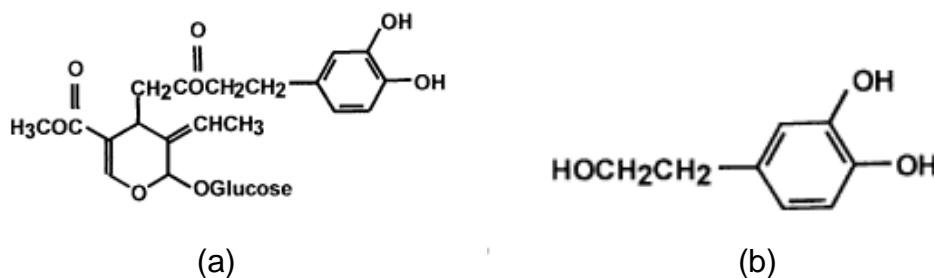


Figura 4 - Estrutura química: a) Oleuropeína e b) Hidroxitirosol.  
Fonte: BENAVENTE-GARCIA et al., 2000.

Dentre os compostos não flavonoides presentes no fruto e na folha de oliveira, se destacam os taninos, os quais são oriundos do metabolismo secundário das plantas, e podem variar de concentração nos tecidos vegetais, dependendo da idade, tamanho, parte coletada, época e local de coleta da planta. Os taninos são compostos de alto peso molecular, que contem grupos hidroxila (SILVA; SILVA, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2004; CHITARRA; CHITARRA, 2005), sendo classificados como hidrolisáveis e não hidrolisáveis (TEIXEIRA et al., 1990; SIMÓN et al., 1999; SINGLETON; KRATZER, 1999; LARCHER, 2000).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e de ácido hexahidroxidifênico e glicose, além de outros polióis. Nos compostos que ocorre a hidrólise ácida, há a liberação de ácidos fenólicos, como os ácidos gálico, caféico, elágico e um açúcar. Estes compostos são subdivididos em galotaninos e elagitaninos, que produzem ácido gálico e ácido elágico,



respectivamente, após hidrólise (Figura 5) (NASCIMENTO; MORAIS, 1996; AGOSTINE-COSTA et al., 2003), os quais possuem peso molecular inferior aos taninos condensados, e assim podem ser hidrolisados com mais facilidade (TAIZ; ZEIGER, 2004).

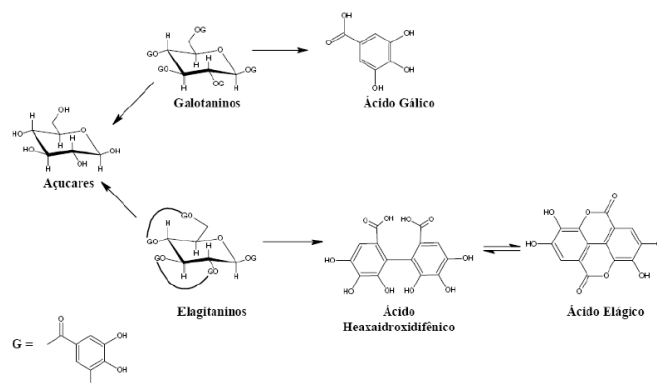


Figura 5 - Estruturas de taninos hidrolisáveis.

Fonte: QUEIROZ et al., 2002.

Os taninos não hidrolisáveis ou condensados são polímeros de flavonoides, cujos monômeros de unidades flavan-3-ol, ou um derivado, são unidos por uma ligação carbono-carbono (Figura 6) (QUEIROZ et al., 2002; AGOSTINE-COSTA et al., 2003). Estes compostos estão presentes na fração fibra alimentar e podem ser considerados indigeríveis ou levemente digeríveis (BARTOLOMÉ et al., 1995).

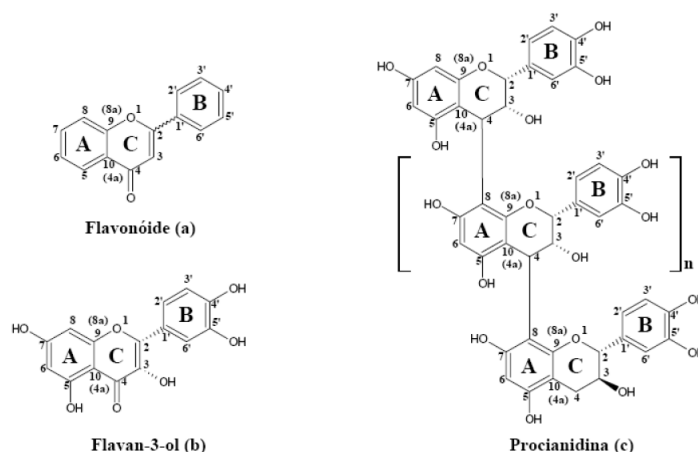


Figura 6 - Fórmulas estruturais: a) um flavanóide genérico, b) flavan-3-ol e c) tanino condensado.

Fonte: QUEIROZ et al., 2002.

A determinação destes compostos em alimentos é dificultada pela enorme variedade estrutural e sua natureza polimérica, bem como a falta de

padrões comerciais específicos. Assim, os taninos foram inicialmente identificados pelo seu sabor adstringente e pela sua capacidade de precipitar proteínas solúveis (SILVA; SILVA, 1999).

#### **2.4.2 Clorofilas**

Clorofilas são pigmentos verdes naturais presentes em maior quantidade nas plantas, as quais são encontradas nos cloroplastos da célula vegetal. Estudos realizados em diferentes plantas apontam que os pigmentos clorofilianos são os mesmos, assim, as diferenças em relação a cor das plantas ocorre em virtude da presença e da distribuição de outros pigmentos associados, como os carotenoides (VON ELBE, 2000; BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Quimicamente, as clorofilas são moléculas complexas, pertencentes à classe das porfirinas, que por sua vez possuem estrutura básica cíclica formada por quatro anéis pirrólicos unidos por quatro grupos metil (C-H), e aos nitrogênios dos anéis pirrólicos estão ligados íons de magnésio. No quarto anel pirrólico, o ácido propiônico está esterificado por um álcool acíclico de cadeia longa, geralmente o fitol, conferindo à clorofila um caráter hidrofóbico (BOBBIO; BOBBIO, 2001; SCHOEFS, 2002).

Estes pigmentos estão presentes em todos os organismos que realizam fotossíntese, sendo que sua presença e abundância varia de acordo com a espécie. A clorofila *a* (Chl 'a') é o pigmento utilizado para realizar a fase fotoquímica - primeiro estágio do processo fotossintético – ao passo que os outros pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência de energia para os centros de reação, sendo assim denominados pigmentos acessórios. No grupo dos pigmentos acessórios está incluída a clorofila *b* (Chl 'b'), que está presente em vegetais superiores, algas verdes e bactérias; a clorofila *c* (Chl 'c'), presente em feófitas e diatomáceas; e a clorofila *d* (Chl 'd'), presentes em algas vermelhas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As Clorofilas 'a' e 'b' (Figura 7) são as clorofilas mais abundantes na natureza e estão presentes na proporção de 3:1, respectivamente, e diferem entre si nos substituintes do carbono C-3. Na Chl 'a', o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) no C-3 e a Chl 'b' contém um grupamento aldeído (-

CHO), que substitui o grupo metil (-CH<sub>3</sub>) (VON ELBE, 2000; BOBBIO; BOBBIO, 2001).

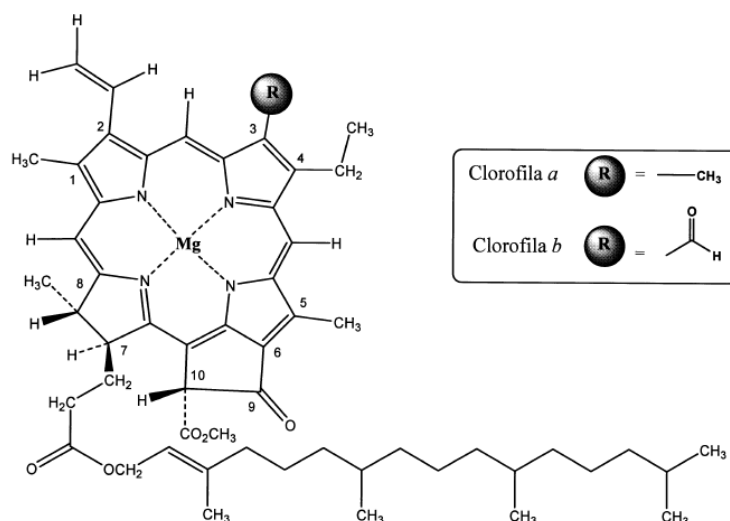


Figura 7 -Estrutura química da Chl 'a' e Chl 'b'.  
Fonte: STREIT et al., 2005.

A mudança na coloração durante o amadurecimento ou a senescência de vegetais é resultado da degradação das clorofilas que, enquanto presentes, mascaram a cor dos outros pigmentos. Estes pigmentos são quimicamente instáveis e sensíveis à luz, temperatura e concentração de oxigênio (SCHOEFS, 2002).

São atribuídas as clorofilas algumas propriedades funcionais, devido à sua ação anticarcinogênica (FUNAMOTO et al., 2002) e antimutagênica (MORITA et al., 2001).

Em folhas de oliveira da cultivar Arbequina foram encontrados teores de clorofilas totais, 'a' e 'b' de 46,1; 33,1 e 13 (mg.100g<sup>-1</sup>), respectivamente (MACHADO; NASCIMENTO; ROSA, 2014). Segundo Criado et al. (2007) durante o amadurecimento da azeitona da cultivar Arbequina, o conteúdo de clorofila diminuiu de 28,5 mg.100g<sup>-1</sup> (coloração verde) para 0,31mg.100g<sup>-1</sup> (coloração escura), verificando-se assim que as folhas de oliveira apresentam conteúdos de clorofilas totais superiores aos frutos da azeitona.

### 2.4.3 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos de ocorrência natural em vegetais, de caráter lipossolúvel e que apresentam colorações que variam entre amarelo,

laranja e vermelho. São encontrados nos cloroplastos da célula vegetal, juntamente com as clorofilas. Durante o processo de amadurecimento das frutas, os cloroplastos normalmente se transformam em cromoplastos, estimulando assim, a síntese de novos carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; BOBBIO; BOBBIO, 2003; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Do ponto de vista químico, carotenoides são compostos polisoprenóides e podem ser divididos em dois grupos (QUIRÓS; COSTA, 2006):

- Carotenos ou carotenóides hidrocarbonos - que são compostos apenas de carbono e hidrogênio; neste grupo encontram-se o  $\beta$ -caroteno e o licopeno (Figura 8).

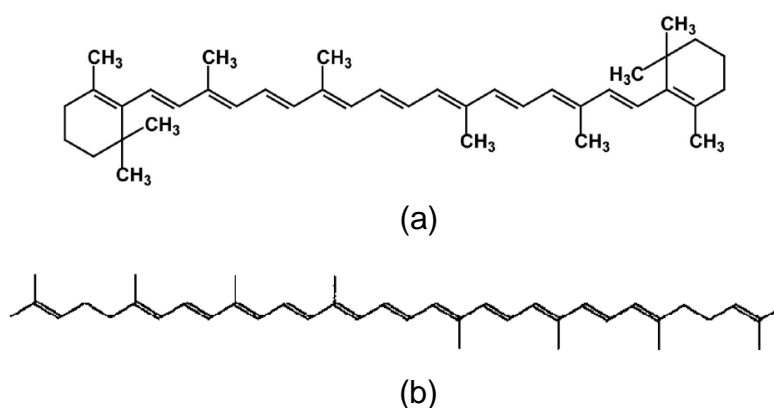
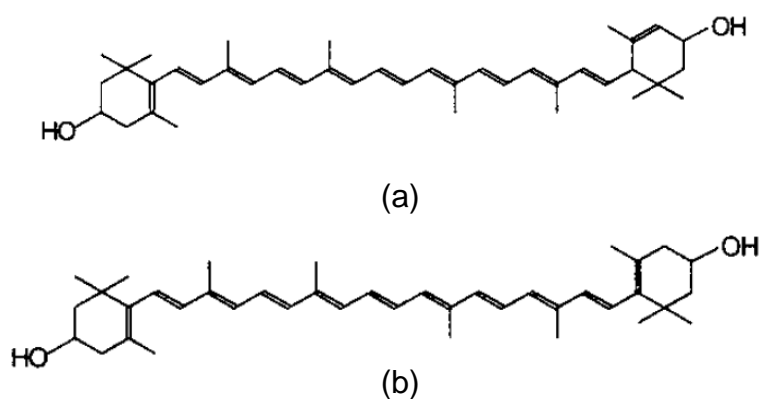


Figura 8 - Estrutura química: a)  $\beta$ -caroteno e b) Licopeno.  
Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, 2001.

- Xantofilas - que são derivados oxigenados dos carotenos e contém pelo menos uma função hidroxí, ceto, epóxi, metoxi ou ácido carboxílico; neste grupo estão incluídos a luteína, zeaxantina e astaxantina (Figura 9).



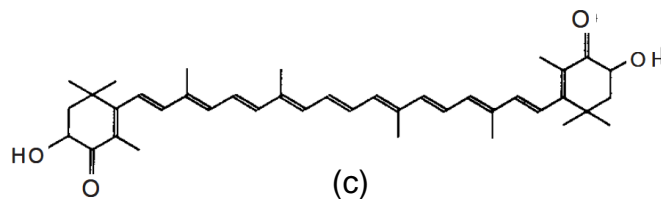


Figura 9 - Estrutura química: a) Luteína, b) Zeaxantina e c) Astaxantina.  
Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, 2001.

Estes compostos constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos na natureza, devido às suas inúmeras funções, larga distribuição e diversidade estrutural (OLIVER; PALOU, 2000). Uma das suas principais funções é a atividade provitamínica A. A vitamina A é essencial para a diferenciação celular, para a visão, para o crescimento ósseo, na reprodução e na integração do sistema imunológico, sendo que sua deficiência pode resultar em anemia (LAYRISSE, 2000). Dentre os carotenóides, o  $\beta$ -caroteno é o que apresenta maior atividade de vitamina A e o mais abundante em alimentos (OLSON, 1999).

Os diversos carotenoides apresentam biodisponibilidades diferenciadas. Em decorrência da presença das insaturações, eles são sensíveis à luz, temperatura, acidez e à presença de oxigênio (AMBRÓSIO, 2006; GOMES, 2007).

O conteúdo de carotenoides depende de vários fatores, incluindo a variedade genética, estágio de maturação e manuseio pós-colheita (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005).

Segundo Pacetta (2007), foram encontrados nas folhas de oliveira de 22,95 a 26,12  $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de carotenoides, expressos como luteína e zeaxantina, respectivamente. O teor de  $\beta$ -caroteno encontrado foi de 10,76  $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ .

## 2.5 Folhas de Oliveira: Benefícios e Aplicações

As folhas da oliveira são consideradas como coprodutos da indústria oleícola, juntamente com o bagaço pós extração do azeite. As folhas são obtidas após a poda e/ou colheita da azeitona, sendo normalmente utilizadas na alimentação animal ou como fertilizante orgânico (FERNÁNDEZ-BOLAÑOS et al., 2006; GUINDA, 2006).

Há muito tempo se explora a capacidade farmacológica da oliveira, tanto das folhas, frutos, quanto do azeite. Desde a antiguidade as folhas da oliveira são utilizadas na forma de chá para curar infecções microbianas, bem como na forma de emplastos para auxiliar na cicatrização de ferimentos. Suas propriedades estão associadas aos inúmeros compostos presentes, e dentre eles a oleuropeína, ácidos graxos insaturados, sais minerais e vitaminas do complexo B (PACETTA, 2007; EL; KARAKAYA, 2009).

Atualmente, tem sido relatado na literatura que os extratos das folhas de oliveira apresentam um alto poder antioxidante (AL-AZZAWIE; ALHAMDANI, 2006), propriedades anti-inflamatórias (BENAVENTE-GARCIA et al., 2000), além de ação hipotensiva, hipoglicemiante (SOMOVA et al., 2003), bem como ações farmacológicas benéficas a saúde como antimicrobiana (BISIGNANO et al., 1999), antiviral (MICOL et al., 2005) e antitumoral (HAMDI; CASTELLON, 2005). Ademais, pesquisas apontam também que as folhas de oliveira melhoram o perfil lipídico no sangue (ANDRIKOPOULOS; ANTONOPOULON; KALIORA, 2002). Essas atividades estão relacionadas principalmente com o elevado teor de compostos fenólicos, principalmente da oleuropeína. (MACHADAO et al., 2007; PEDROZA, 2010).

Em estudo realizado por Bisignano et al. (1999) para verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos polifenóis isolados oleuropeína e hidroxitirosol contra bactérias patogênicas no homem, em 5 cepas bacterianas padrão (*Haemophilus influenzae* ATCC 9006, *Moraxella catarrhalis* ATCC 8176, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e 44 isolados clínicos (oito linhagens de *Haemophilus influenzae*, seis cepas de *Moraxella catarrhalis*, quinze cepas de *Salmonella*, uma cepa de *Vibrio cholerae*, duas cepas de *Vibrio alginolyticus*, uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* - cinco cepas sensíveis à *penicilina* e seis cepas resistentes à *penicilina*), foi constatado pelas concentrações inibitórias mínimas (MIC) ampla atividade antimicrobiana. Além disso, a oleuropeína exerceu efeito inibitório também no crescimento de várias estirpes bacterianas. Com relação ao mecanismo de ação da atividade antimicrobiana desses polifenóis, o estudo demonstrou que estes compostos penetram nas membranas celulares estruturalmente diferentes das bactérias

gram-negativas e gram-positivas, causando ruptura dos peptidoglicanos celulares, danificando assim a membrana celular.

Al-azzawie; Alhamdani (2006) avaliaram o efeito da suplementação de oleuropeína na redução do estresse oxidativo e hiperglicemia em coelhos diabéticos aloxano induzidos. Após a indução de diabetes, foi observado em todos os animais diabéticos um aumento significativo no plasma e eritrócitos de malonaldeído (MDA) e glicose no sangue, bem como a alteração em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Após o tratamento, os níveis de MDA junto com a glicose no sangue e a maioria dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos foram significativamente restaurados para valores que não eram diferentes dos coelhos saudáveis. Os coelhos diabéticos não tratados demonstraram alterações persistentes no marcador de estresse MDA, glicemia e nos parâmetros antioxidantes. Estes resultados demonstraram que a oleuropeína pode atuar na inibição da hiperglicemia e no estresse oxidativo induzido pela diabetes, o que sugere que a administração de oleuropeína pode ser útil na prevenção de complicações diabéticas associadas com o estresse oxidativo.

Com base no exposto, a folha de oliveira possui alto potencial antioxidante e biológico, apresentando possíveis efeitos benéficos à saúde, sendo um produto que não tem valor agregado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização físico-química e avaliar o conteúdo de compostos bioativos, e a atividade antioxidante e biológica de extratos de folhas de 5 cultivares de oliveira (Arbequina, Koroneiki, Arbosana, Frontoio, Manzanilha).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição físico-química das folhas de oliveira (pH, acidez, titulável, umidade, cinzas, fibras, proteínas, lipídios, carboidratos);
- Quantificar os minerais presentes na folha pela técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES);
- Quantificar os principais compostos bioativos presentes na folha por espectrofotometria (compostos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolisados, taninos condensados, carotenoides e clorofilas);
- Quantificar os compostos fenólicos individuais presentes na folha pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas (CLAE-MS);
- Avaliar a atividade antioxidante das folhas de oliveira por 3 técnicas (DPPH, FRAP e ABTS);
- Avaliar o potencial antimicrobiano de extratos aquosos das folhas de oliveira frente as bactérias *S. aureus* e *E. Coli*, por 3 técnicas (disco-difusão, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima);
- Avaliar o efeito do extrato aquoso de folha de oliveira frente à dietas hiperlipídicas com ensaios *in vivo*, verificando a influência do extrato na glicose, perfil lipídico e peroxidação lipídica de ratos *Wistar*.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção das amostras**

Folhas de cinco cultivares de oliveiras (Arbequina, Koroneiki, Frontoio, Arbosana, Manzanilha) foram adquiridas na Estância Guarda Velha, localizada no município de Pinheiro Machado/RS (31°29'59,4" S e 53°30'32,7" W). Cerca de 2kg de folhas foram coletadas aleatoriamente de cerca de 3 plantas de cada variedade. Após a colheita, as folhas foram moídas e congeladas a -80°C para a posterior realização das análises, onde foram conduzidos dois experimentos.

### **4.2 Experimentos**

Para a realização do Experimento I foi feito um delineamento experimental completamente casualizado com três repetições, em esquema unifatorial, onde o Fator A consistiu em cinco níveis representados pelas diferentes cultivares de folhas de oliveiras. As variáveis de composição físico-química foram determinadas no Laboratório de Cromatografia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/FAEM). A análise de determinação de minerais foi realizada no Laboratório de Metrologia Química e a análise de determinação da capacidade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM), ambos do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA/UFPel).

O experimento II foi realizado a partir dos resultados obtidos no experimento I, utilizando o extrato de folhas de oliveira da cultivar Koroneike. O delineamento foi completamente casualizado, com esquema bifatorial, com 6 repetições. Os fatores de tratamento foram o tipo de ração (normocalórica e hiperlipídica) e o líquido (água e extrato). Neste experimento foi realizado um ensaio biológico para avaliar efeitos metabólicos do extrato da folha de oliveira em ratos *Wistar* submetidos à dietas hiperlipídicas, que foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental, na Faculdade de Nutrição (FN/UFPel).

### **4.3 Caracterização físico-química**

#### **4.3.1 Determinação do pH**

O pH foi determinado em pHmêtro de bancada previamente calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0 (ITAL, 2008).

#### **4.3.2 Determinação da acidez titulável**

A acidez titulável foi determinada por volumetria potenciométrica, indicada para amostras escuras ou fortemente coloridas. As amostras foram diluídas em água e homogeneizadas, então o pH foi determinado em pHmêtro de bancada previamente calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0. As soluções foram tituladas com hidróxido de sódio 0,1 M até uma faixa de pH entre 8,2-8,4. Os resultados foram expressos em % (ITAL, 2008).

#### **4.3.3. Determinação do teor de umidade**

Para a determinação do teor de umidade, utilizou-se o método de secagem em estufa até o peso constante, sendo os resultados expressos em % (ITAL, 2008).

#### **4.3.4 Determinação do teor de cinzas**

Para a determinação de cinzas, inicialmente a amostra foi seca em estufa com circulação forçada à 105°C. Logo após ocorreu a incineração da amostra em mufla a 550°C, com posterior pesagem, onde os resultados foram expressos em % (ITAL, 2008).

#### **4.3.5 Determinação do teor de lipídios**

Na quantificação de lipídios foi utilizado 10 g de amostra em aparelho extrator tipo Soxhlet, sendo acoplado ao extrator um balão de fundo chato previamente pesado, contendo hexano. O balão foi mantido sob aquecimento em chapa elétrica por 8 h. Transcorrido este tempo, o conjunto foi retirado e o hexano evaporado. O balão com o resíduo extraído foi transferido para estufa a 105°C e mantido por cerca de 1h, após resfriado em dessecador até a temperatura ambiente para posterior pesagem, sendo o resultado lípidico expresso em percentual (ITAL, 2008).

#### **4.3.6 Determinação do teor de proteínas**

Esta determinação foi conduzida utilizando o método de Micro Kjeldahl, através das etapas de digestão, destilação e titulação, utilizando cerca de 0,2 g de amostra. O teor de nitrogênio foi determinado com solução de ácido

clorídrico 0,1 N, que após aplicado o fator de conversão, os resultados foram expressos em % (ITAL, 2008).

#### **4.3.7 Determinação do teor de fibras**

A determinação de fibras foi realizada por extração em solução ácida, utilizando cerca de 2 g de amostra, e então incinerada em mufla a 550°C, os resultados foram expressos em % (ITAL, 2008).

#### **4.3.8 Determinação do teor de carboidratos**

O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, proteína, lipídeos, fibras e cinzas, segundo Association of Official Analytical Chemists (2003).

### **4.4 Minerais**

Para a determinação dos minerais, utilizou-se aproximadamente 250 mg de amostra, a qual foi decomposta com HNO<sub>3</sub> 65% v/v bidestilado em um bloco digestor com sistema de refluxo acoplado aos tubos digestores, conforme metodologia utilizada no Exercício Colaborativo CRM-Agro FT\_012016 (2016), para posterior quantificação dos minerais pela técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES). Os resultados foram expressos em micrograma por grama de amostra.

### **4.5 Determinação de Compostos Bioativos**

#### **4.5.1 Compostos fenólicos**

A determinação do total de compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método descrito por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Foi utilizado 2 g de amostras diluídas em 20 mL de metanol, mantidas em banho termostático à 25°C por 2 h. Após o mesmo foi filtrado com algodão, e transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com metanol. Foi utilizado 1 mL deste extrato, adicionado de 10 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, deixando-se reagir por 3 min e adicionando 1,5 mL carbonato de sódio 20%, sendo a reação mantida por 2 h.

A leitura da absorvância dos extratos foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) a 765 nm, usando metanol para leitura do branco. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por g de amostra seca, através da construção de uma curva padrão.

#### **4.5.2 Flavonoides**

A determinação de flavonóides foi realizada de acordo como o método descrito por Funari e Ferro (2006), com pequenas modificações. Foi utilizado 0,1 g de amostra e 5 mL de etanol PA, onde deixou-se extraindo durante 24 h à temperatura de 25°C com agitação constante, após 24 h filtrou-se os extratos em algodão e avolumou-se para 10 mL. Utilizou-se 1 mL dos extratos etanólicos, que em um tubo de ensaio foi adicionado de 3 mL de etanol PA e 200 µL de cloreto de alumínio 2,5%, onde foi agitado em vortex e manteve-se em repouso por 40 min.

A leitura da absorvância dos extratos foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) a 415 nm, usando etanol para leitura do branco. Os resultados foram expressos em miligramas de quercetina por g de amostra, através da construção de uma curva padrão.

#### **4.5.3 Taninos**

##### **4.5.3.1 Taninos Condensados**

O conteúdo total de taninos condensados foi estimado colorimetricamente segundo o método de PRICE et al. (1978), com adaptações. Para a extração dos taninos foram utilizados 200 mg de amostra, as quais se adicionou 10 mL de solução de ácido clorídrico 1% em metanol, agitando-se por 2 h. Após ser centrifugado por 10 min a 7000 rpm, foi retirado 1 mL do extrato e adicionado 5 mL de solução vanilina 1:1 (vanilina 1% em metanol; ácido clorídrico 8% em metanol), deixando-se reagir por 15 min e efetuando-se a leitura em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech), no comprimento de onda de 500 nm.

A quantificação foi baseada no estabelecimento de uma curva padrão e os resultados foram expressos em miligramas de catequina equivalente por gramas de peso da folha em base seca.

#### 4.5.3.2 Taninos Hidrolisados

O conteúdo total de taninos hidrolisados foi estimado colorimetricamente segundo o método de BRUNE et al. (1991), com adaptações. Para a extração dos taninos utilizou-se 1 g de amostra, as quais foram adicionados 50 mL de metanol, agitando-se por 10 min seguido de repouso por 1 h. Após filtração, foi retirado 2 mL do extrato, e adicionado 8 mL da solução de sulfato ferroso amoniacal - FAS (89%: uréia:acetato 1:1; 10%: goma arábica 1% em água deionizada; e 1%: sulfato férrico de amônio 5% em ácido clorídrico 1M), deixando-se reagir por 15 min. Após foi efetuada a leitura em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech), no comprimento de onda 680 nm, usando metanol para zerar o equipamento.

A quantificação foi baseada no estabelecimento de uma curva padrão e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por gramas de peso da folha em base seca.

#### 4.5.4 Carotenoides

O conteúdo total de carotenoides foi determinado segundo método de Rodriguez-Amaya (1999), com adaptações. Foram utilizados 2 g de amostra e 1 g de celite, em que se adicionou 20 mL de acetona gelada, procedendo-se a agitação por 10 min para a extração dos pigmentos. Após foi realizada uma filtração a vácuo e lavagem com acetona gelada, até que o filtrado ficasse incolor. Então o mesmo foi transferido para um funil de separação, onde adicionou-se 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de água, a parte inferior (fase aquosa) foi descartada e a parte superior (fase lipossolúvel – pigmento) transferida para um balão volumétrico e aferida com éter de petróleo.

Foi realizada a leitura da absorvância do extrato em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech), no comprimento de onda de 450 nm. A quantificação foi realizada através da Equação 1 e os resultados expressos em miligramas de  $\beta$ -caroteno por g de folha em base seca.

$$\text{Carotenóides totais} = \frac{\text{Absorbância} \times \text{volume do extrato (mL)} \times 10^6}{2500 \times 100 \times \text{g de amostra}} \quad (1)$$

#### 4.5.5 Teor de Clorofilas

Amostras de 1 g foram adicionadas à 5 mL de acetona a 80% (v/v). O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min e o sobrenadante transferido para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se esse volume com acetona a 80% (v/v). A absorvância do extrato foi obtida por espectrofotometria a 647 e 663 nm, o equipamento Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech), foi ser zerado com acetona 80%. Os teores de clorofilas totais, 'a' e 'b' foram calculados através das Equações 2, 3 e 4, estabelecidas por Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em miligramas por g de folha em base seca.

$$Chl\ totais = 7,15 (A_{663}) + 18,71 (A_{647}) \quad (2)$$

$$Chl\ 'a' = 12,25 (A_{663}) - 2,79 (A_{647}) \quad (3)$$

$$Chl\ 'b' = 21,50 (A_{663}) - 5,10 (A_{647}) \quad (4)$$

#### 4.6 Compostos fenólicos individuais (LC-MS)

O preparo dos extratos foi realizado de acordo com método descrito por De Vos et al. (2007), com modificações. Foram utilizados 100 mg de amostra, adicionado de 1mL de uma mistura de metanol e água (3:1; acidificado com 0,1% de ácido fórmico). A mistura foi agitada em vórtex por 10 s e os extratos sonicados por 15 min à 40 kHz, em temperatura ambiente. Após, o extrato foi centrifugado à 9900 x g por 5 min, o sobrenadante foi coletado e o processo de extração repetido.

Para a realização da análise, 450 µL dos extratos foram misturados com 50 µL de reserpina à 200 µg.mL<sup>-1</sup> (padrão interno) e filtrados em filtro de seringa de nylon de 0,22 µm. Foram injetados 10 µL dos extratos em cromatógrafo líquido (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna Bidentate C18 (100 x 2.1mm) (MicroSolv Technology Corporation, Leland, NC, EUA). As fases móveis foram: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). Para separação foi utilizado um gradiente: 0,00 min – 5% B, 0,01 – 15,00 min, 90% B, 15,00 – 18,00 min, 90% B, 18,01 – 20,00 min, 5%

B, permanecendo por 6 min nessa condição para estabilização da pressão na coluna analítica. O fluxo foi de  $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e a temperatura da coluna mantida a  $40^\circ\text{C}$ .

Os espectros de massas e os perfis de fragmentação foram processados por meio do software *Data analysis 4.0* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O software *ProfileAnalysis™* (versão 2.0, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) foi utilizado para o processamento dos dados de LC-MS/MS, pelo qual é gerado uma matriz de dados que contém a lista de picos detectados por amostra, relacionando as informações de tempo de retenção (TR), relação  $m/z$  e intensidade de cada composto detectado. Posteriormente, foi realizado o alinhamento do tempo de retenção, normalização e escalonamento. Neste trabalho foi utilizado a normalização por soma das intensidades e escalonamento por Pareto (*Pareto scaling*).

Para explorar o conjunto de dados foram realizadas análises multivariadas. Foi utilizada a análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA). Essas análises foram realizadas no software *MetaboAnalyst 3.0*. Nos compostos discriminantes foi realizada uma quantificação relativa pelo padrão interno adicionado. A identificação dos metabólitos foi realizada através da comparação dos valores de  $m/z$ , espectro de massas e o perfil de fragmentação obtidos com os disponíveis em bases de dados online, com uma janela de precisão de massa de 5 ppm. A fórmula molecular para cada composto foi selecionada de acordo com a relação  $m/z$  medida e o padrão isotópico por meio de uma ferramenta analítica *Smart Formula* (Bruker Compass, *Data analysis™*) que fornece uma lista de possíveis fórmulas moleculares combinando a massa precisa e a distribuição isotópica. A identidade da apigenina, do ácido hidroxibenzóico, do campferol, da luteolina, da oleuropeína, da quercetina, da rutina e tirosol foi confirmada com padrões externos. Para a quantificação dos compostos fenólicos foram preparadas curvas de calibração nas concentrações de 39 a  $5000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os parâmetros utilizados para a validação da análise de compostos fenólicos foram na faixa de linearidade, precisão, especificidade, limite de detecção e quantificação (AOAC, 2002). Para construir a curva de calibração,  $20 \mu\text{L}$  de cada padrão na concentração de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram misturados para fazer a solução mãe de

compostos fenólicos ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A partir da solução mãe foram realizadas diluições seriadas (1:2), em metanol, variando de 39 a  $5000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cada solução foi injetada em triplicata. A partir dessas injeções foi avaliada a repetitividade. A precisão intermediária foi avaliada a partir da injeção de três concentrações dos padrões em três dias diferentes. Os resultados de repetitividade e precisão intermediária foram apresentados como coeficiente de variação (%).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados com base no coeficiente angular (a) e no desvio padrão (S) do coeficiente linear (b) da curva analítica. O LD e o LQ foram determinados de acordo com as equações 5 e 6. Os resultados foram expressos em miligramas por g de amostra.

$$\text{LD} = 3,3 \times (\text{desvio-padrão do coeficiente linear} / \text{coeficiente angular}) \quad (5)$$

$$\text{LQ} = 10 \times (\text{desvio-padrão do coeficiente linear} / \text{coeficiente angular}) \quad (6)$$

## **4.7 Atividade Antioxidante**

### **4.7.1 Preparo do extrato**

Foram pesados 2 g da amostra em tubo de Falcon, aos quais se adicionou 20 mL de metanol. Após a mistura foi homogeneizada em vórtex, seguido do armazenamento por 24 h sob agitação e banho-maria à  $25^\circ\text{C}$ . Após o extrato foi filtrado com algodão e armazenado em vidro âmbar sob refrigeração até a realização das análises.

### **4.7.2 DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)**

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos compostos presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH, segundo método de Brand-Williams (1995), com modificações. Foi preparada uma solução de DPPH pesando-se 24 mg, dissolvendo em 100 mL de metanol e armazenando à  $-20^\circ\text{C}$ . A partir desta, preparou-se uma solução de uso, onde é retirada 10 mL da solução e dilui-se em 4 mL de metanol. A absorvância desta solução é ajustada para  $1,1 \pm 0,02$ , em comprimento de onda de 517 nm.



Para a quantificação da atividade antioxidante, 100  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra foram adicionados a 3,9 mL da solução uso de DPPH, com a finalidade de completar o volume de 4 mL, a mistura foi homogeneizada em vórtex. A amostra foi lida em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) após 30 min de reação, a um comprimento de onda de 517 nm.

A atividade sequestrante de radicais livres foi determinada pela comparação com uma curva padrão de Trolox (5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), e os resultados expressos em  $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$  amostra, sendo a capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa.

#### **4.7.3 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Esta atividade antioxidante foi determinada através da capacidade redutora de ferro, determinada de acordo com o método descrito por Silva et al. (2013), com modificações. Foi preparada a solução FRAP, onde se adicionou 10 mL de tampão acetato, 1 mL de TPTZ (2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine) e 1 mL de cloreto férrico.

Para a quantificação da atividade antioxidante, 100  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra foram adicionados a 300  $\mu\text{L}$  de água destilada e 3 mL de solução FRAP, então a mistura foi homogeneizada em vórtex. A amostra foi lida em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) após 30 min de reação (em banho-maria à 37°C), a um comprimento de onda de 595 nm.

A capacidade redutora de ferro foi determinada pela comparação com uma curva padrão de Trolox (5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), e os resultados expressos em  $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$  amostra, sendo a capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa.

#### **4.7.4 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))**

A atividade antioxidante por ABTS foi determinada através da capacidade dos compostos presentes nas amostras em sequestrar o radical ABTS, segundo método de Re et al. (1999), com modificações. Foi preparada uma solução de ABTS, onde se adicionou 5 mL de ABTS 7 mM e 88  $\mu\text{L}$  de persulfato de potássio 140 mM, a mistura foi mantida no escuro, à temperatura

ambiente por 16 h. Em seguida, diluiu-se 1 mL da mistura em metanol até obter a absorvância de  $1,410 \pm 0,010$  a 734 nm.

Para a quantificação da atividade antioxidante, 100  $\mu$ L do extrato da amostra foram adicionados a 3,9 mL de solução de ABTS. A amostra foi homogeneizada e lida em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) após 6 min de reação, em um comprimento de onda de 734 nm.

A atividade sequestrante de radicais livres foi determinada pela comparação com uma curva padrão de Trolox (5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), e os resultados expressos em  $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$  amostra, sendo a capacidade antioxidante equivalente a Trolox relativa.

#### **4.8 Atividade Antimicrobiana**

A avaliação do efeito antimicrobiano dos extratos de folhas de oliveira foi realizada por meio de três metodologias fenotípicas: disco difusão, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Foram testados os efeitos antimicrobianos do composto sobre uma cepa padrão gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 43895) e outra gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 10832). A escolha das cepas se deve ao fato delas serem consideradas micro-organismos de referência para esse tipo de análise, sendo o primeiro um micro-organismo patógeno.

##### **4.8.1 Preparação do extrato vegetal**

Para a preparação dos extratos vegetais, foi realizada uma infusão com 1,2 g de folha de oliveira que ficaram imersas em 150 mL de água à 100°C por 15 min, em uma concentração de 0,008 g/mL, de acordo com a preparação de chás comerciais.

##### **4.8.2 Preparação das culturas bacterianas**

As bactérias utilizadas no experimento foram mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h à 37°C. Após uma alçada desse crescimento foi estriada

em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli* e ágar Baird-Paker para *S. aureus*, e incubadas por 24 h à 37°C, para o isolamento das colônias.

Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.8.3 Disco-Difusão**

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015a), com pequenas modificações.

A solução salina contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após 10 µL do extrato foram impregnados sobre os discos de papel e as placas incubadas por 24 h a 37°C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em centímetros.

#### **4.8.4 Atividade Antibacteriana**

A atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015b), com pequenas modificações.

Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde se acrescentou em cada poço 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina com crescimento bacteriano) e o extrato em três diferentes concentrações - 1:100 (100 µL de extrato puro); 1:1000 (10 µL de extrato e 90 µL de DMSO) e 1:10000 (1 µL de extrato e 99 µL de DMSO). Foram utilizados três controles: sem o inóculo, sem o extrato vegetal e sem o inóculo e extrato vegetal.

Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram lidas em espectrofômetro (Biochrom EZ Read 400) entre 620 nm e 630nm. Em seguida,

procedeu-se a incubação por 24 h a 37°C, e após, foi realizada nova leitura em espectrofotômetro. A CIM é considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar Triptona de soja (TSA) e incubados por 24 h a 37°C. É considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

#### **4.9 Ensaios Biológicos *versus* dietas hiperlipídicas**

Foi realizado o ensaio biológico com 24 ratos machos, cepa *Wistar/UFPel* (adultos), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), acomodados em trios em caixas moradia, de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) com bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 mL, rolha de borracha antiácida e bico de aço inoxidável reto acoplado à caixa.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição (FN/UFPEL), com temperatura e umidade relativa de 23±1°C e 50-60%, respectivamente, com alternância automática de ciclos claro-escuro em períodos de 12 h. Semanalmente foram alteradas as disposições das caixas a fim de proporcionar aos animais uma melhor distribuição de luz e ruídos presentes no ambiente e, conseqüentemente, diminuir fatores ambientais causadores de estresse.

O ensaio teve duração de 70 dias, incluindo 4 dias de adaptação ao ambiente de experimentação. O presente estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPEL e aprovado sob o número 23110.004842/2016-64. Foram tomadas todas as medidas necessárias para o bem-estar dos animais, conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (2003), descritas no manual sobre cuidado e usos de animais de laboratório.

Para a realização do ensaio biológico, os animais foram divididos e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 6 animais cada, com dieta e água fornecidas à vontade. O experimento teve 2 grupos controle (N e H) e 2 grupos tratamento (NE e HE), onde os animais foram alimentados com dieta normocalórica - ração comercial (Nuvilab®) e com ração comercial acrescida

de 20% de gordura animal suína. Para a preparação dos extratos vegetais, foi realizada uma infusão com folhas de oliveira na concentração 0,008 g/mL, que foi oferecida aos animais conforme Tabela 1. Nas primeiras 4 semanas do experimento, 12 animais foram alimentados com ração (N) e os outros 12 animais com ração e gordura animal suína (H). Nas 4 semanas posteriores, 6 animais continuaram com ração (N) e outros 6 continuaram com ração e gordura animal suína (H), 6 animais foram alimentados com ração e extrato (NE) e outros 6 com ração, gordura animal suína e extrato (HE). Ao final do experimento, após jejum de 6 h, os animais foram submetidos à eutanásia, e a finalização foi realizada com pentobarbital sódico, com via de acesso intraperitoneal, na concentração 100 mg.Kg<sup>-1</sup>. Posteriormente foi coletado sangue e retirados o fígado, coração e rins dos animais.

Tabela 1 - Dietas Experimentais.

Grupos	Dietas
NE	Normocalórica + Extrato
N	Normocalórica + Água
HE	Hiperlipídica + Extrato
H	Hiperlipídica + Água

#### 4.9.1 Análises Bioquímicas

##### 4.9.1.1 Glicemia

A medida da glicemia foi realizada em glicosímetro Advantage Roche®, utilizando uma gota de sangue coletado em seguida da eutanásia.

##### 4.9.1.2 Perfil Lipídico

As frações plasmáticas de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TAG) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinadas utilizando *kits* enzimáticos comerciais.

O sangue coletado foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min para se obter o plasma sanguíneo, que foi transferido para tubos de Eppendorfs e congelado a -20°C até o momento das análises.

O colesterol total (CT) foi quantificado por sistema enzimático Labtest Diagnóstica® colesterol liquiform cat. 76-2/100. O colesterol HDL foi determinado através da precipitação das lipoproteínas de baixa densidade e de

muito baixa densidade (LDL e VLDL), utilizando o sistema enzimático Labtest Diagnóstica® colesterol liquiform cat. 13. O VLDL foi calculado pela Equação 7. Os triacilgliceróis (TAG) foram determinados pelo sistema enzimático Labtest Diagnóstica® (GPO-ANA cat. 59-4/50), com posterior leitura em espectrofotômetro a 510 nm (REEVES et al., 1993; FRIEDWALD et al., 1972).

$$VLDL = \frac{\text{Triacilglicerol}}{5} \quad (7)$$

#### 4.9.1.3 Índice de Peroxidação Lipídica

A formação de malonaldeído (MDA), o qual consiste em um índice de peroxidação lipídica, foi medido no fígado, coração e rins dos animais, por meio da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Esterbauer; Cheeseman (1990).

As amostras foram preparadas fazendo-se um pool dos órgãos de cada grupo, onde foram macerados os órgãos isoladamente. Então 1 g do pool dos órgãos foi adicionado de 10 mL de NaCl 0,9% e homogeneizado em homogeneizador tipo “potter”, e então centrifugado a 10000 rpm por 5 min.

Foi utilizado 200 µL de amostra, adicionado de 500 µL de água ultra pura, 200 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 500 µL de tampão de ácido acético (pH 3,4) e ácido tiobarbitúrico 0,6% (pH 4,0), esta mistura foi deixada em banho termostático por 1h à 100°C. Então a mistura foi centrifugada à 10000 rpm por 5 min. Para cada amostra foi feito um branco, onde não foi adicionado TBA.

A leitura da absorvância das amostras foi realizada em espectrofotômetro Femto Cirrus 80 MB, usando metanol para leitura do branco. Os resultados foram expressos em mmol de malonaldeído (MDA) por g de amostra.

#### 4.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em médias e desvio padrão referentes às determinações realizadas em triplicata. Com a utilização de programa estatístico SAS foram realizados: análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (Tukey) ao nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização físico-química e proximal

Pela análise dos resultados físico-químicos, as folhas de oliveira foram constituídas em maior quantidade por água, seguida da fração de carboidratos e do teor de proteínas; ressaltando-se o alto conteúdo em fibras (Tabela 2). Observa-se que os resultados da análise físico-química para as folhas de oliveira no presente estudo estão de acordo com os dados existentes na literatura.

Tabela 2 - Resultados das análises físico-químicas das folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016.

Análises	Frantoio	Koroneike	Manzanilha	Arbosana	Arbequina
Umidade (%)	48,48±0,02d <sup>1/</sup>	51,79±0,16c	55,79±0,16a	55,55±0,15a	54,29±0,41b
Cinzas (%)	3,75±0,04 <sup>NS</sup>	4,38±1,46	3,00±0,01	3,26±0,04	3,44±0,11
Fibras (%)	11,02±0,19 <sup>NS</sup>	10,45±1,05	11,01±1,31	10,46±0,90	9,32±0,91
Lipídios (%)	6,20±0,19b	4,62±0,12d	3,77±0,11e	7,85±0,00a	5,59±0,34c
Proteínas (%)	12,93±0,49 <sup>NS</sup>	13,38±0,25	17,07±0,25	12,69±3,01	13,25±0,25
Carboidratos (%)	17,55±0,35a	15,86±1,62a	8,63±0,46b	10,64±2,71b	14,61±0,11a
Acidez (%)	17,96±1,53 <sup>NS</sup>	18,70±0,39	19,26±1,16	18,15±1,84	18,26±1,90
pH	5,79±0,08a	5,63±0,04a	5,86±0,01a	5,25±0,18b	5,89±0,04a

<sup>1/</sup> Média (± desvio padrão) acompanhadas por mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). <sup>NS</sup> Não significativo pelo teste F da análise de variância ( $p \leq 0,05$ ).

O teor de umidade das folhas de oliveira variou de 48,48 a 55,79%, sendo que a cultivar Manzanilha apresentou o maior teor. Cavalheiro et al. (2015) descreve valores de umidade que variaram entre as cultivares analisadas, de 39,30 a 64,80%, sendo que a cultivar Arbosana apresentou conteúdo de 59,33% e a Koroneike de 61,91%.

Nas folhas de oliveira foi encontrado um teor de cinzas que variou de 3,00 a 4,38%; as folhas da cultivar Koroneike apresentaram o maior conteúdo. Teor similar (4,38%) foi encontrado por Cavalheiro et al. (2014) ao avaliar a cultivar Arbequina cultivada na cidade de Caçapava do Sul. O teor de cinzas indica o conteúdo de minerais presentes, entretanto, cabe considerar que as condições ambientais de cultivo podem levar à contaminações, especialmente por metais, que em elevadas concentrações podem ser tóxicos. O acúmulo de metais pesados pode ser devido a poluição por fontes externas como: emissões das fábricas, metalurgia de não-ferrosos, combustão da gasolina com

chumbo em rodovias movimentadas e pelo uso de agroquímicos (MUÑOZ-OLIVAS; CAMARA, 2001).

O teor de fibras das folhas de oliveira variou de 9,32 a 11,02%. Gomez-Cabrera et al. (1992), que avaliaram folhas de oliveira de diversas cultivares, encontraram um teor médio de fibras de 18,6%, teor superior ao encontrado no presente estudo.

O teor de lípidios das folhas variou de 3,77 a 7,85%, tendo a cultivar Arbosana apresentado o maior percentual. Cavalheiro et al. (2015), encontrou um teor médio de lípidios nas folhas de oliveira de 9,50%, sendo que as folhas da cultivar Arbosana apresentaram um teor de 9,80% e a Koroneike de 9,19%. No entanto, Boudhrioua et al. (2009) relatam teores de lípidios de 1,05 a 1,30% em folhas de oliveira das cultivares Chemlali, Chemchali, Zarrazi e Chetoui cultivadas na Tunísia. Martín-García et al. (2003) avaliou folhas de oliveira cultivadas na Espanha e encontrou um teor de lípidios de 3,21%. Esta informação, se faz importante, especialmente se forem essenciais os ácidos graxos encontrados na fração lipídica das folhas de oliveira.

Encontrou-se um teor proteico nas folhas de oliveira que variou de 12,69 a 17,07%, sendo que a cultivar Manzanilha apresentou o maior percentual. Em alguns estudos foi encontrado um teor inferior do presente estudo, nos quais em média foi de 7% (MARTÍN-GARCÍA et al., 2003; BOUDHRIOUA et al., 2009; ERBAY; ICIER, 2009). Cavalheiro et al. (2015) relatam teores de 10 e 50% para as cultivares Arbosana e Koroneike, respectivamente, e de 12,24% em folhas da cultivar Arbequina (CAVALHEIRO et al., 2014).

As folhas de oliveira apresentaram um teor de carboidratos que variou de 8,63 a 17,55%, sendo que a cultivar Frantoio apresentou o maior teor. Boudhrioua et al. (2009), encontrou em média um teor de carboidratos de 40% para as cultivares cultivares Chemlali, Chemchali, Zarrazi e Chetoui. Porém, foram encontrados estudos em que o teor de carboidratos variou de 8,74 a 32,63% entre as cultivares Arbequina, Ascolano, Arbosana, Negrinha do Freixó, Koroneiki e Grappolo (CAVALHEIRO et al., 2014; CAVALHEIRO et al., 2015).

Encontrou-se uma variação de acidez para as folhas de oliveira de 17,96 a 19,26%, e um pH que variou de 5,25 a 5,89. Em estudo realizado por LUNKES; HASHIZUME (2014), ao avaliarem a acidez titulável e o pH de chás



comerciais de folhas de oliveira disponíveis no mercado brasileiro, encontraram valores que variaram de 3,77 a 12,68 para a acidez e de 2,89 a 4,03 para o pH. Não se observou uma relação direta entre a alta acidez e o valor de pH nas folhas. O alto conteúdo de acidez pode estar relacionada com os ácidos orgânicos não dissociados e com a influência de compostos de caráter ácido.

As folhas de oliveira cultivadas na Região da Campanha Gaúcha apresentam uma composição química interessante frente àquelas apresentadas por variedades cultivadas em outros países. Os altos teores de fibras e de proteínas encontrados, sugerem que as folhas de oliveira cultivadas nesta região podem servir como um suplemento alimentar.

## 5.2 Minerais

Segundo Taiz; Zeiger (2008) as deficiências minerais desequilibram o metabolismo da planta, em função da deficiência ou quantidade excessiva de um elemento, podendo induzir deficiência ou acumulação excessiva de outro. De acordo com dados da literatura, o conteúdo ideal de minerais em plantas alimentares e medicinais é aconselhável para uma vida saudável, em virtude de que doses excessivas e/ou a acumulação desses elementos, particularmente os metais pesados, podem causar sérios problemas de saúde.

No presente estudo foi possível observar que o conteúdo dos elementos Al, B e Cu de todas as cultivares analisadas, e que o conteúdo do Zn nas cultivares Frantoio e Arbosana, ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado (Tabela 3).

Tabela 3 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método de determinação de minerais

Elemento	LD (mg kg <sup>-1</sup> )	LQ (mg kg <sup>-1</sup> )
Al	0,001	0,0033
B	0,0009	0,0029
Ca	0,0004	0,0013
Cu	0,0003	0,0009
Fe	0,0003	0,0009
K	0,0004	0,0013
Mg	0,0004	0,0013
Na	0,0006	0,0019
Mn	0,0006	0,0019
P	0,0005	0,0016
Zn	0,0003	0,0009

Observou-se que, de maneira geral, os minerais presentes nas folhas de oliveira em maior concentração foram o K e Ca, e em menor concentração o Fe, Mg, Na, Mn, P e Zn (Tabela 4). Estudo realizado por Cavalheiro et al. (2015), os quais avaliaram o conteúdo mineral de folhas de oliveira cultivadas no Sul do Brasil, encontraram em maior concentração o Al, Ca, Fe, K, Mg, P e S. Bahloul; Kechaou; Mihoubi (2014) ao avaliarem folhas de oliveira cultivadas na Tunisia, obtiveram maiores concentrações de Ca e K, e em menor concentração Mg, Na e Cu, como no presente estudo. Estudos também demonstraram que a concentração de Mn, Fe, Zn, Ca, Mg, K e P presentes nas folhas de oliveira da variedade Koroneiki, cultivadas na Grécia, não sofreu influência em relação ao tipo de solo em que as plantas foram cultivadas (CHATZISTATHIS et al., 2010).

Tabela 4 - Conteúdo de minerais nas folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016.

Elementos	Concentração, $\bar{x} \pm SD$ (RSD*), $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$				
	Frantoio	Koroneike	Manzanilha	Arbosana	Arbequina
Al	<LD	< LD	< LD	< LD	< LD
B	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Ca	3,92±0,21 (5,3)	2,98±0,18 (6,0)	1,94±0,19 (9,8)	2,91±0,19 (6,5)	2,45±0,12 (4,9)
Cu	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fe	0,035±0,002 (5,7)	0,045±0,002 (4,4)	0,03±0,002 (6,7)	0,047±0,002 (4,2)	0,0097±0,0008 (8,2)
K	7,76±0,35 (4,5)	6,39±0,31 (4,9)	5,21±0,32 (6,1)	5,72±0,10 (1,8)	8,0±0,3 (3,4)
Mg	0,60±0,02 (1,2)	0,50±0,03 (6,0)	0,39±0,02 (5,1)	0,58±0,02 (3,4)	0,51±0,02 (3,9)
Na	0,10±0,01 (10,0)	0,14±0,006 (4,3)	0,084±0,002 (2,3)	0,20±0,02 (10,0)	0,036±0,003 (8,3)
Mn	0,06±0,003 (5,0)	0,016±0,0012 (7,5)	0,05±0,005 (10,0)	0,012±0,009 (7,5)	0,02±0,001 (5,0)
P	0,03±0,002 (6,7)	0,05±0,004 (8,0)	0,013±0,10 (7,7)	0,05±0,004 (8,0)	0,05±0,002 (4,0)
Zn	< LD	0,02±0,0019 (9,5)	0,01±0,006 (6,0)	< LD	0,04±0,0023 (5,6)

\*Desvio padrão relativo

A determinação da composição mineral das folhas de oliveira demonstrou que o potássio e o cálcio são os minerais predominantes. O potássio é um macronutriente que desempenha um papel importante na regulação dos batimentos cardíacos, mantém os balanços fluidos e ajuda a

contrair os músculos. O cálcio atua no desenvolvimento e manutenção dos ossos. Assim, uma ingestão adequada de cálcio e potássio contribuem para prevenir vários tipos de doenças (MCCARRON; REUSSER, 2001).

A sustentabilidade da vida depende da capacidade do organismo de fornecer equilíbrio entre os minerais, já que estes são necessários para habilitar enzimas para várias respostas biológicas (PRASAD; BISHT, 2011).

A determinação dos elementos minerais presente nas folhas de oliveira, é importante tanto na agricultura, como na nutrição humana, pois permite detectar deficiências ou excessos nutricionais que podem comprometer o crescimento e desenvolvimento da planta (FERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2010), além de verificar o valor nutricional dos alimentos (SAHAN, BASOGLU, GUCER, 2007).

### 5.3 Compostos Bioativos

Os resultados obtidos nas análises de compostos bioativos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Conteúdos de compostos bioativos das folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016.

Análises	Frantoio	Koroneike	Manzanilha	Arbosana	Arbequina
Total de Clorofilas (mg.g <sup>-1</sup> )	0,48±0,02 <sup>NS</sup>	0,47±0,04	0,46±0,01	0,38±0,02	0,44±0,07
Clorofila 'a' (mg.g <sup>-1</sup> )	0,33±0,01 <sup>NS</sup>	0,32±0,03	0,32±0,00	0,27±0,02	0,30±0,05
Clorofila 'b' (mg.g <sup>-1</sup> )	0,15±0,00a <sup>1/</sup>	0,15±0,01ab	0,14±0,01ab	0,11±0,01b	0,14±0,03ab
Carotenóides (mg β-caroteno.g <sup>-1</sup> )	8,09±0,48a	8,21±0,10a	6,87±0,35bc	5,69±0,23bc	5,20±0,26c
Compostos Fenólicos (mg EAG.g <sup>-1</sup> )	9,82±0,23a	10,88±0,52a	8,24±0,63b	10,00±0,32a	6,51±0,09c
Flavonóides (mg EQ.g <sup>-1</sup> )	20,71±0,69a	12,69±0,85b	9,53±0,008c	13,13±0,63b	10,18±0,72c
Taninos Hidrolisados (mg EAG.g <sup>-1</sup> )	7,34±0,93ab	8,2±0,70a	6,52±0,04b	6,33±0,48b	7,39±0,01ab
Taninos Condensados (mg ECAT.g <sup>-1</sup> )	0,01±0,0000a	0,0002±0,0001ab	0,0004±0,0001abc	0,0040±0,0006c	0,0016±0,0002c

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste F da análise de variância (p≤0,05). <sup>1/</sup> Média (± desvio padrão) acompanhadas por mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

O conteúdo total de clorofilas das folhas de oliveira variaram de 0,38 a 0,48 mg.g<sup>-1</sup>, para a clorofila 'a' foi encontrado uma variação de 0,27 a 0,33 mg.g<sup>-1</sup> e em relação a clorofila 'b' encontrou-se valores que variaram de 0,11 a 0,15 mg.g<sup>-1</sup>. Mesmo não havendo diferença significativa, as folhas da cultivar Arbosana foram as que apresentaram o menor conteúdo do total de clorofilas,

influindo também no menor conteúdo da clorofila “a” e “b”. Bahloul; Kechaou; Mihoubi (2014), ao avaliarem folhas de oliveira cultivadas na Tunisia, obtiveram como resultado para o conteúdo total de clorofilas valores entre 1,132 a 1,795  $\text{mg.g}^{-1}$ , de 0,281 a 0,854  $\text{mg.g}^{-1}$  para clorofila ‘a’ e de 0,851 a 1,114  $\text{mg.g}^{-1}$  para a clorofila ‘b’, demonstrando que o teor de clorofilas das folhas de oliveira parece variar com a cultivar. Além disso, o conteúdo de clorofila é geralmente afetado por vários fatores como temperatura, fotoperíodo, nitrogênio, água e grau de maturidade (CHEN et al., 2011; LEE et al., 2011). As clorofilas vem sendo empregadas como corantes naturais, para restabelecer o teor natural destas moléculas em produtos alimentares ou para preparar produtos enriquecidos; no entanto, para isso devem ser modificadas quimicamente antes da adição aos alimentos, visto a instabilidade deste compostos a ácidos, calor e luz (BRITTON, 1995; SCHOEFS, 2002). Oliveira et. al (2016), ao avaliarem as mesmas cultivares estudadas no presente estudo e da mesma região onde foram colhidas, encontraram conteúdos de clorofilas superiores, confirmando a hipótese de que diferentes épocas de colheita e região, podem gerar alterações no conteúdo destes compostos.

As amostras de folhas de oliveira apresentaram teores de carotenoides que variaram de 5,20 a 8,21  $\text{mg } \beta\text{-caroteno.g}^{-1}$ , sendo as folhas das variedades Frantoio e Koroneike as que apresentaram o maior teor. De acordo com Brahmi et al. (2012), ao avaliarem folhas de oliveira cultivadas na Tunisia, demonstraram que o conteúdo de carotenoides é influenciado pela idade das folhas, assim como o conteúdo de clorofila. Conteúdos maiores foram observados nas folhas colhidas em fevereiro, quando as folhas completam seu crescimento, do que em outubro, quando as folhas ainda estão crescendo. No presente estudo não ficou evidenciado uma relação direta do conteúdo de carotenoides e de clorofilas, onde as folhas da cultivar Arbosana apresentaram um dos menores conteúdos de carotenoides e também de clorofilas; no entanto, as folhas das cultivares Manzanilha e Arbequina também apresentaram os menores conteúdos de carotenoides, mas elevados conteúdos de clorofilas. Além do tempo de colheita, o conteúdo de carotenoides depende de vários fatores, incluindo a variedade genética e manuseio pós-colheita (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005). Os carotenoides por estarem presentes nos cloroplastos da célula vegetal, juntamente com as

clorofilas, podem estar mascarados, e durante o processo de envelhecimento da planta ocorre mudança de cor devido a degradação das clorofilas, assim os carotenoides presentes são evidenciados (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; BOBBIO; BOBBIO, 2003; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

O conteúdo de compostos fenólicos nas folhas de oliveira variou de 6,51 a 10,88 mg EAG.g<sup>-1</sup>, sendo as folhas das cultivares Manzanilha e Arbequina as que apresentaram o menor conteúdo. Em estudos realizados por Ahmad-Qasem et al. (2013), ao estudar os efeitos da secagem e da desidratação durante o armazenamento de folhas de oliveira de plantas cultivadas na Espanha, da cultivar Serrana, obtiveram como resultado um conteúdo inicial de compostos fenólicos de 8,20 mg EAG.g<sup>-1</sup>, valor semelhante aos encontrados no presente estudo. Guinda et al. (2015) também encontraram valores próximos para algumas cultivares cultivadas na Espanha, como de 8,02 mg EAG.g<sup>-1</sup> para a Arbequina. De acordo com Cavalheiro et al. (2015), ao avaliarem o conteúdo de compostos fenólicos de algumas cultivares de folhas de oliveira cultivadas em Santa Catarina, inclusive as cultivares Arbosana e Koroneike que também foram estudadas no presente trabalho, identificaram a cultivar Arbosana com o maior conteúdo de compostos fenólicos. No entanto, os autores encontraram na cultivar Koroneike o menor conteúdo de compostos fenólicos, resultado oposto ao observado no presente estudo, onde esta cultivar apresentou o maior conteúdo. Muitas variáveis podem afetar a síntese e conteúdo de compostos fenólicos da oliveira, tanto nas folhas quanto nos frutos e no azeite, variáveis essas que incluem a posição na árvore, cultivar, minerais presentes no solo, exposição solar e localização geográfica, a qual demonstrou ter o maior efeito sobre o perfil de compostos fenólicos da oliveira (SEABRA et al., 2005).

As amostras de folhas de oliveira apresentaram conteúdos de flavonoides que variaram de 9,53 a 20,71 mg EQ.g<sup>-1</sup>, sendo que as folhas da cultivar Frantoio apresentaram o maior conteúdo. Os maiores conteúdos de flavonoides estiveram relacionados com os maiores conteúdos de compostos fenólicos das folhas das cultivares Frantoio, Koroneike e Arbosana. Estes teores encontram-se em acordo com os relatados para extratos de folhas de oliveira de diversos países, que se encontram entre 5,46 a 12,47 mg EQ.g<sup>-1</sup>,

sendo relatado a cultivar Frantoio com o maior conteúdo, como encontrado no presente estudo (ORAK; ISBILIR; YAGAR, 2012).

As amostras de folhas de oliveira apresentaram um conteúdo de taninos hidrolisados que variou de 6,33 a 8,2 mg EAG.g<sup>-1</sup>, sendo novamente as folhas da cultivar Koroneike que apresentaram o maior conteúdo. O maior conteúdo de taninos hidrolisáveis também esteve associado com o maior conteúdo de compostos fenólicos das folhas das cultivares Frantoio, Koroneike e Arbosana. O conteúdo de taninos condensados foi muito pequeno, sendo que as folhas da cultivar Frantoio apresentaram o maior conteúdo. Brahmi et al. (2013) ao avaliarem folhas de oliveira cultivadas na Tunísia, colhidas em dois períodos, demonstraram que o conteúdo mais elevado de taninos foi obtido no mês de outubro (1º período), e foi constatado que no mês de janeiro (2º período) houve uma diminuição relativa do conteúdo de taninos, sugerindo que o ciclo vegetativo da oliveira afeta no conteúdo de taninos. No presente trabalho foi constatado um conteúdo significativamente superior para taninos hidrolisados em relação ao conteúdo de taninos condensados; o que também foi observado no trabalho realizado por Abbeddou et al. (2011). São escassos os trabalhos na literatura que analisam taninos nas folhas de oliveira, porém comparando com o conteúdo de outras folhas, pode-se considerar que as folhas de oliveiras possuem um alto conteúdo de taninos. Existe uma grande diversidade de estruturas dos compostos tânicos que são encontradas em plantas com reconhecidas atividades terapêuticas, associada a sua capacidade de complexação com diferentes compostos.

#### **5.4 Compostos fenólicos individuais avaliados por LC-MS**

A análise por CLAE-MS dos extratos de folhas de oliveira das cinco cultivares permitiu a identificação de oito compostos fenólicos: apigenina, ácido hidroxibenzóico, campferol, luteolina, oleuropeína, quercetina, rutina e tirosol. A ocorrência de todos estes compostos foi relatada anteriormente nas folhas de oliveira. A partir da análise dos compostos fenólicos individuais, foi observado que as folhas de oliveira apresentam um maior conteúdo de rutina, campferol e tirosol (Tabela 6).

Tabela 6 - Conteúdo de compostos fenólicos individuais presentes nas folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016.

Compostos fenólicos (mg.g <sup>-1</sup> )	Frantoio	Koroneike	Manzanilha	Arbosana	Arbequina
Apigenina	93,06±21,56b	99,97±22,00b	115,75±10,31b	256,04±10,49a	100,38±13,80b
Ácido hidroxibenzóico	20,10±6,59a	13,60±1,42ab	10,11±4,06bc	18,32±4,17a	7,74±1,32c
Campferol	1721,33±48,99c	2699,10±91,59b	1228,23±94,67d	6847,95±94,31a	1767,61±118,96c
Luteolina	43,09±5,00c	63,76±2,30b	26,78±2,29d	173,93±2,65a	40,69±2,90c
Oleuropeína	43,33±2,93a	40,97±1,49a	42,01±8,20a	38,89±3,10a	32,36±4,02a
Quercetina	2,14±0,10b	2,64±0,86b	2,84±0,25ab	2,36±0,68b	3,48±0,40a
Rutina	1784,97±278,87b	1316,04±86,72c	1457,65±162,21c	5889,40±204,77a	1839,68±357,45c
Tirosol	12900,22±419,20ab	12023,61±678,36abc	11939,02±760,61bc	15828,32±788,22a	9858,94±375,45c

<sup>1/</sup> Média (± desvio padrão) acompanhadas por mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

As folhas da cultivar Arbosana foram as que apresentaram o maior conteúdo de apigenina, campferol, luteolina e rutina. O maior conteúdo de ácido hidroxibenzóico foi encontrado nas folhas da cultivar Frantoio e de quercetina nas folhas da cultivar Arbequina. Diversos trabalhos demonstram que o perfil fenólico varia entre cultivares, localização geográfica (BRAHMI et al., 2013; HOFFMANN et al., 2017).

Segundo Le Tutour; Guedon et al. (1992), a oleuropeína é o polifenol mais abundante na folha de oliveira, porém no presente estudo, a oleuropeína apresentou um baixo conteúdo, o que poderia estar associado ao método de extração. Pacetta (2013), ao estudar diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira contendo oleuropeína, demonstrou que utilizando como solvente etanol combinado com ácido acético, o teor de oleuropeína seria 4,80 g.100g<sup>-1</sup>, superior aos outros métodos e solventes avaliados. Como é conhecido, o conteúdo de polifenóis dos extratos pode alterar em função do solvente utilizado na extração, devido a mudança de polaridade nos diferentes no processo de extração (LUTHRIA et al. 2006; MUKHOPADHYAY et al. 2006).

Xie et al. (2015), ao compararem a composição fenólica das folhas de oliveira e dos frutos (azeitona), demonstraram que as folhas apresentam um conteúdo significativamente maior de compostos fenólicos do que os frutos, sugerindo que a síntese de compostos polifenólicos nas plantas depende do grau de exposição solar e das as relações de água durante o período de

vegetação. Assim, a folha de oliveira provavelmente recebe mais exposição solar e água do que o fruto. Diferentes autores têm relatado que a oleuropeína e os flavonóides são os principais componentes de extratos etanólicos, enquanto que o hidroxitirosol e ácidos fenólicos são os principais componentes dos extratos aquosos (LEE et al., 2009; HERRERO et al., 2011; QUIRANTES-PINÉ et al., 2012).

### 5.5 Atividade antioxidante

Observou-se que as técnicas de inibição por DPPH, FRAP e ABTS apresentam resultados diferentes na capacidade antioxidante. Por DPPH, os extratos das folhas das cultivares Frantoio e Arbosana, foram as que apresentaram maior poder de resgatar radicais livres. Enquanto que pelo método FRAP, os extratos das cultivares Koroneike e Arbosana foram as que apresentaram maior atividade antioxidante. Em relação ao método ABTS, os extratos das folhas de cultivares que apresentaram a maior atividade antioxidante foram a Arbequina e a Arbosana (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores da atividade antioxidante das folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016, avaliados pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS.

Atividade antioxidante	Frantoio	Koroneike	Manzanilha	Arbosana	Arbequina
DPPH ( $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$ )	73,44 $\pm$ 2,67a <sup>1/</sup>	67,63 $\pm$ 1,07b	63,34 $\pm$ 1,64bc	73,02 $\pm$ 1,57a	62,92 $\pm$ 0,86c
FRAP ( $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$ )	78,25 $\pm$ 5,78b	98,19 $\pm$ 0,92a	68,35 $\pm$ 0,95c	91,48 $\pm$ 0,10a	39,56 $\pm$ 0,73d
ABTS ( $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$ )	66,63 $\pm$ 1,71b	70,30 $\pm$ 0,54ab	60,59 $\pm$ 2,19c	71,21 $\pm$ 1,23a	73,49 $\pm$ 0,71a

<sup>1/</sup> Média ( $\pm$  desvio padrão) acompanhadas por mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em estudo realizado por Yancheva; Mavromatis; Georgieva (2016), ao avaliarem a atividade antioxidante de cultivares de folhas de oliveira, pelos mesmos métodos utilizados no presente estudo, encontraram valores para a cultivar Koroneike de 69,7; 76,2 e 51,3  $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$ , para DPPH, ABTS e FRAP, respectivamente. Bahloul et al. (2013) ao avaliarem folhas de oliveira cultivadas na Tunísia, colhidas em dois períodos, demonstraram que a atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos das folhas colhidas no 2º período (mês de janeiro) foi superior aos extratos das folhas colhidas no 1º período (mês de outubro), sugerindo que a atividade antioxidante de folhas é influenciada pela idade das folhas, uma vez que em janeiro as folhas já tinham



completado seu crescimento, e devido ao grande conteúdo de polifenóis, os quais atuam como sequestradores de radicais livres. Assim, esses resultados indicaram a efetividade de fatores ambientais na eficácia de sequestrar radicais livres das folhas colhidas em dois períodos diferentes do ano. No entanto, a atividade antioxidante medida pelo método ABTS, resultou no oposto, as folhas colhidas no 1º período apresentaram uma atividade antioxidante maior do que as folhas colhidas no 2º período. Esta diferença pode ser atribuída à natureza dos compostos fenólicos presentes nas folhas do 1º período, os quais podem reagir com o radical ABTS mais efetivamente do que com o DPPH.

No presente trabalho, no geral, pelo método FRAP foi obtido uma atividade antioxidante superior para os extratos das folhas das cultivares estudadas, exceto da cultivar Arbequina. Assim, confirmou-se que a atividade de eliminação de radicais livres é influenciada por fatores climáticos, cultivar e época de colheita. Estudos relataram que a atividade antioxidante de extratos de folhas de oliveira são dependentes do perfil fenólico (BOUAZIZ; SAYADI, 2005; KIRITSAKIS et al., 2010).

Cada método de análise apresenta particularidades, devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, assim dificilmente haverá um único teste *in vitro* representativo da verdadeira atividade antioxidante de um composto. O tipo e a polaridade do solvente podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que são aspectos chaves na medida da atividade antioxidante, além de que a presença de outros compostos nas soluções testadas também pode afetar os resultados (RUFINO et al.; 2007).

Devido à considerável atividade antioxidante, as folhas de oliveira das cultivares estudadas apresentam potencial para serem empregadas no desenvolvimento de produtos alimentícios, de forma a serem fonte natural de compostos bioativos e por representar uma alternativa para minimizar o descarte de resíduos ao meio ambiente.

## **5.6 Atividade Antimicrobiana**

Frente aos riscos de contaminação microbiana de alimentos, e a demanda por produtos naturais, as potencialidades apresentadas pelas folhas de oliveira como antibacterianos naturais, as qualificam como opções potenciais para a substituição dos conservantes sintéticos. No entanto, para

prospectar uma real aplicação tecnológica das folhas de oliveira como bioconservantes para alimentos, faz-se necessário um maior detalhamento sobre sua atividade antimicrobiana frente aos diferentes tipos de bactérias patogênicas que podem acometer os alimentos durante o seu processamento, como é o caso da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A *Escherichia coli* é um micro-organismo gram-negativo, presente do trato gastrointestinal do homem e animais (FORSYTHE, 2013). A *E. coli* O157:H7 é um dos mais importantes patógenos transmitidos por alimentos, devido a produção da toxina de Shiga que pode causar doenças severas, como a colite hemorrágica, que pode evoluir para síndrome hemolítica urêmica (BUCHANAN, 1997; AMANI et al., 2015).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, mesófila, que está presente nas fossas nasais, cabelo e pele de humanos, tornando os manipuladores de alimentos as principais fontes de contaminação dos produtos alimentícios (FORSYTHE, 2013). Devido à capacidade de algumas cepas produzirem enterotoxinas, *S. aureus* é um importante patógeno transmitido por alimentos (HENNEKINNE et al., 2010). Além disso, a habilidade de formar biofilme pode fazer com que este micro-organismo se torne uma contaminação persistente no ambiente de processamento de alimentos (GUTIÉRREZ et al., 2012).

Pelos resultados do Disco Difusão, a formação de halos e seu tamanho indicam a suscetibilidade das bactérias frente aos extratos, quando estes halos forem menores que 0,7 cm são considerados não-ativos frente a bactéria, e quando apresentarem diâmetro maior que 1,2 cm são considerados de efeito inibitório satisfatório, segundo Arora & Kaur (1999). Em razão disto, foi observado que os extratos de folhas de oliveira foram ativos frente as bactérias avaliadas, apenas para determinadas cultivares (Tabela 8).

Tabela 8 - Halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão por aplicação de extratos de folhas de oliveira frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Cultivares	Halo de inibição (cm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Frantoio	0,00±0,00	0,73±0,09
Koroneike	0,58±0,11	0,00±0,00
Manzanilha	0,00±0,00	0,00±0,00
Arbosana	0,78±0,11	0,00±0,00
Arbequina	0,35±0,49	0,00±0,00

\*Média e desvio padrão.

De acordo com os resultados, foi possível observar que a *Escherichia coli* foi inibida pelos extratos das folhas das cultivares Koroneike, Arbosana e Arbequina, com halos que variaram de 0,35 a 0,78 cm, sendo os extratos das folhas da cultivar Arbequina o que obteve o maior halo de inibição. No entanto, a bactéria *Staphylococcus aureus* foi inibida somente pelos extratos das folhas da cultivar Frantoio, com um halo de inibição de 0,73 cm.

Em estudo realizado por Lee & Lee (2010), os quais avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de oliveira, frente as mesmas bactérias, não foram evidenciados halos de inibição. ALIABADI et al. (2012), também constataram que extratos de folhas de oliveira não inibiram as mesmas bactérias na mesma concentração do extrato avaliado neste trabalho; porém, em concentrações maiores de extrato (50 mg.mL<sup>-1</sup>) obtiveram halos de inibição de até 0,9 cm para a *Staphylococcus aureus* e para a bactéria *Escherichia coli* obtiveram halos de inibição de até 0,82 cm, também na concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>.

De acordo com Pereira et al. (2007), a atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas da oliveira frente as bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, demonstraram que o extrato possui uma forte atividade inibitória em relação a *E. coli* e *S. aureus* em comparação com os restantes micro-organismos patogênicos. Com base neste experimento foi determinado a concentração inibitória mínima, bem como a concentração bactericida mínima dos extratos de folhas de oliveira das diferentes cultivares estudadas frente estas bactérias (Tabela 9 e 10).

Tabela 9 - Concentração inibitória mínima dos extratos de folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016, frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Cultivares	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )*	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Frantoio	24	2,4
Koroneike	2,4	2,4
Manzanilha	2,4	2,4
Arbosana	2,4	2,4
Arbequina	2,4	2,4

\*concentrações inibitórias mínimas.

De acordo com os resultados foi possível observar que os extratos das folhas da cultivar Frantoio apresentaram uma concentração inibitória mínima de 24 mg.mL<sup>-1</sup> para a bactéria *E. coli* e de 2,4 mg.mL<sup>-1</sup> para a bactéria *S. aureus*. Todas as outras cultivares apresentaram uma concentração inibitória mínima de 2,4 mg.mL<sup>-1</sup> para ambas as bactérias.

Em estudo realizado por Teramoto et al. (2017), que avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de duas cultivares de folhas de oliveira, onde foi determinado a concentração inibitória mínima, obtiveram como resultado para a cultivar Koroneike um valor de 1 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Para a cultivar Arbosana, a concentração inibitória mínima foi de 2 mg.mL<sup>-1</sup>, para ambas as bactérias. Pelo estudo destes autores, foi possível observar que em todas as cultivares estudadas ocorreu crescimento microbiano, indicando assim que a concentração bactericida mínima das folhas de oliveira foi maior que as concentrações avaliadas no presente trabalho.

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 (PUUPPONEN-PIMIÄ, 2001; PEREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007).

São relatados em estudos que o hidroxitirosol e a oleuropeína demonstraram inibir ou atrasar a taxa de crescimento de vários agentes patogênicos intestinais ou respiratórios em humanos, como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*,

*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus* (BISIGNANO et al., 1999).

Tabela 10 - Concentração bactericida mínima os extratos de folhas de oliveira das cultivares Frantoio, Koroneike, Manzanilha, Arbosana e Arbequina, safra 2016, frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Cultivares	Crescimento microbiano*	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Frantoio	+	+
Koroneike	+	+
Manzanilha	+	+
Arbosana	+	+
Arbequina	+	+

\* + crescimento microbiano detectado.

As bactérias gram-positivas são mais sensíveis do que as gram-negativas, e isto está relacionada às características estruturais das próprias bactérias. Enquanto as bactérias gram-positivas possuem em sua parede celular apenas uma camada, composta majoritariamente por peptidoglicano, as gram-negativas possuem uma membrana externa extra, composta por uma camada dupla de lipopolissacarídeos (NAZZARO; FRATIANNI; MARTINO, 2013). Esta camada de lipopolissacarídeos, nas bactérias gram-negativas, seria mais resistente a passagem de pequenas moléculas antimicrobianas do que a camada de peptidoglicano das bactérias gram-positivas (RAI et al., 2017). Em consequência, são necessárias maiores concentrações de extrato para promover a ação antimicrobiana, porém, não foi verificada essa diferença nas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Através da técnica de disco-difusão, foi observado que as bactérias foram inibidas pelo extrato de algumas cultivares de folha de oliveira, que foi constatado pela formação de halos. No entanto, ao determinar a concentração bactericida mínima foi detectado crescimento bacteriano nas mesmas cultivares, verificando assim que não houve atividade inibitória na concentração avaliada. A ausência de inibição não significa necessariamente que o extrato seja inativo frente ao micro-organismo testado, mas que a difusão não foi completa, especialmente para os compostos menos polares que se difundem mais lentamente no meio de cultura (Moreno et al., 2006). Este fato pode estar relacionado com a dificuldade de difusão do extrato no meio de cultura, ou

ainda, devido às características lipofílicas de algumas amostras e/ou a natureza química de substâncias isoladas (Rios et al., 1988).

No presente estudo, o extrato das folhas de oliveira exerceu efeito inibitório nas bactérias testadas, sugerindo atividade antimicrobiana dos extratos. Certamente, a composição química das folhas de oliveira condicionou os efeitos antimicrobianos observados.

### **5.7 Ensaios Biológicos *versus* Dietas Hiperlipídicas**

A população mundial vem demonstrando crescente preocupação com a alimentação, uma vez que o tipo e a qualidade dos alimentos consumidos têm sido mencionados no conjunto de fatores para a prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas não transmissíveis, como câncer, diabetes, hipertensão, doenças coronarianas e obesidade (LIMA et al., 2000; CINTRA et al., 2006).

Considerando que as doenças cardiovasculares têm se destacado por serem as principais causas de morte e incapacidade no mundo, e entre um dos principais fatores de risco se encontram as dislipidemias (LIMA, 2000; RIEDIGER et al., 2008), esta realidade faz com que ocorra incentivo à indústria alimentícia para investir em produtos saudáveis e nos alimentos com propriedades funcionais. Torna-se, assim, de suma importância avaliar a ação hipocolesterolêmica da folha de oliveira, já que estudos têm demonstrado que as folhas da oliveira melhoram o perfil lipídico no sangue (ANDRIKOPOULOS; ANTONOPOULON; KALIORA, 2002).

Assim, para investigar a relação entre as disfunções do metabolismo do colesterol e a aterogênese, diversos modelos animais têm sido utilizados. Esses modelos têm sido de grande importância para a compreensão da origem da aterosclerose e para a descoberta de novos agentes terapêuticos. O rato é a espécie mais adequada para fornecer informações da lipogênese, a via é bem representada no tecido adiposo e no fígado (MAYES, 1994). Alguns estudos têm demonstrado a eficácia da ingestão de dietas hiperlipídicas na gênese da obesidade e de suas comorbidades, principalmente em roedores da linhagem *Wistar*. Este modelo de indução da obesidade por dieta, também tem sido utilizado para investigar disfunções endoteliais, visto que a maioria dos estudos os animais submetidos a esse tratamento apresentam importantes

alterações metabólicas, como o aumento do colesterol (PETRY, 2000; DOBRIAN, 2000).

### 5.7.1 Consumo alimentar, Ganho de peso, Peso dos órgãos

O consumo de ração, água e extrato de folhas de oliveira foi calculado por meio do somatório de avaliações diárias entre dieta fornecida e a consumida durante o experimento. Na Tabela 11 estão os valores de consumo alimentar durante o experimento.

Tabela 11 - Consumo total de ração, água e extrato de folhas de oliveira durante o experimento com ratos Wistar.

Grupos	Consumo de ração (Kg)	Consumo de água ou extrato (L)
NE	4,81±0,34b <sup>1/</sup>	4,17±0,03a
N	5,15±0,10ab	3,74±0,06b
HE	5,24±0,06a	2,86±0,14c
H	5,30±0,06a	2,78±0,05c

<sup>1/</sup> Médias (± desvio padrão) acompanhadas por mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Observa-se que não houve diferença significativa para o consumo de ração entre os grupos NE e N e entre os grupos N, HE e H, indicando que o extrato de folha de oliveira não afetou o consumo de ração entre os grupos. No entanto, ao observar a utilização do extrato de folha de oliveira e dietas hiperlipídicas, verificou-se efeito positivo quando consumido juntamente com dieta normocalórica. Além disso, entre os animais alimentados com as dietas hiperlipídicas, o efeito do maior conteúdo lipídico da dieta poderia ter influenciado na maior saciedade, diminuindo a ingestão de líquidos (KRISTENSEN et al., 2012). Com relação à ingestão de líquidos, os grupos de ratos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre si, havendo maior consumo do extrato para o grupo NE, e por conseguinte, uma maior ingestão de antioxidantes e/ou substâncias bioativas.

O ganho de peso dos animais foi calculado por diferença entre os pesos mensurados no início e no final do experimento (Figura 10). O grupo NE apresentou o menor ganho de peso, diferindo somente para o grupo hiperlipídico; o extrato demonstrou efeito positivo quando associado à dieta normocalórica.

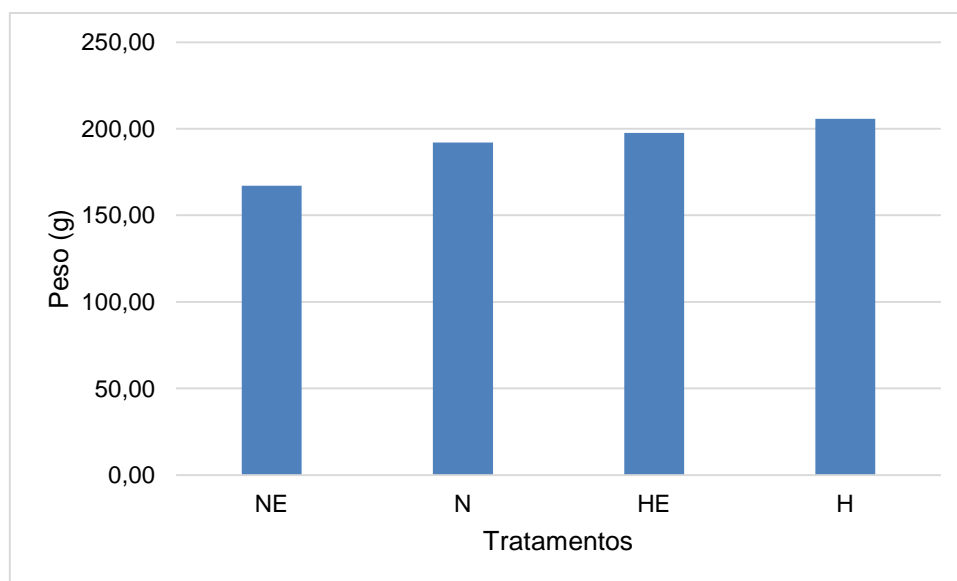


Figura 10 - Ganho de peso de ratos Wistar durante o experimento.

Jemai et al. (2008), ao avaliarem ratos *Wistar* alimentados com uma dieta rica em colesterol e tratados com hidroxitirosol para avaliar seu efeito na redução do colesterol, não verificaram diferença estatística quanto ao ganho de peso total em relação ao grupo controle, demonstrando que o hidroxitirosol não apresentou ação no ganho de peso em dieta normocalórica e em dieta hiperlipídica. Este resultado difere dos achados no presente estudo, onde foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do consumo de extrato de folhas de oliveira associada à dieta normocalórica, quando comparada à dieta hiperlipídica.

O ganho de peso se deu devido ao valor calórico total consumido pelos animais, que de acordo com os dados de consumo, foi menor para o grupo em dieta normocalórica e que consumiu o extrato de folhas de oliveira, assim os dados se justificam. Além de que o ganho de peso pode ocorrer também pela alimentação rica em gorduras, que é comprovadamente um dos fatores indutores do ganho de peso e pode estar relacionada com o aparecimento de morbidade, como as dislipidemias, além de influenciar na peroxidação lipídica, uma vez que, são observadas correlações positivas entre marcadores de peroxidação lipídica e os níveis de colesterol e triacilgliceróis no organismo (CINTRA et al., 2006; MUNIZ et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Na Tabela 12 são apresentados os valores para o peso do fígado, rins e coração dos animais experimentais.



Tabela 12 - Peso dos órgãos dos animais

Grupos	Fígado (g)	Rins (g)	Coração (g)
NE	14,45±1,05 <sup>NS</sup>	2,76±0,21 <sup>NS</sup>	1,34±0,11 <sup>NS</sup>
N	14,90±0,71	2,87±0,30	1,33±0,13
HE	15,03±1,09	2,71±0,45	1,18±0,10
H	13,96±1,15	2,48±0,13	1,18±0,09

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste Tukey da análise de variância ( $p \leq 0,05$ )

Observa-se de acordo com o apresentado na tabela 12 que os maiores valores absolutos de peso para o fígado e rins foram em animais submetidos as dietas hiperlipídicas com extrato (15,03 g no grupo HE) e normocalórica com água (2,87 g no grupo N). Em se tratando do coração, o maior peso ocorreu no grupo NE com o valor de 1,34 g e menor peso nos grupos HE e H com o valor de 1,18 g para ambos os grupos. Sendo que o peso dos órgãos não diferiu significativamente nos grupos avaliados.

Poudyal; Campbell; Brown et al. (2010) ao avaliarem ratos suplementados com extrato seco de folhas de oliveira misturadas à dieta, observaram uma redução no peso do fígado, que provavelmente deve-se à deposição reduzida de colágeno e deposição de gordura no fígado. O mesmo foi encontrado por Jemai et al. (2008), ao avaliarem o efeito do hidroxitirosol, um polifenol presente na folha da oliveira, isolado e diluído em água, em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol, com a diminuição do peso do fígado, rins e coração. Os autores concluíram que os compostos fenólicos poderiam reduzir a acumulação de lípidos nos órgãos. Fki et al. (2007) observaram o mesmo efeito nos órgãos, com a diminuição do peso, quando ratos foram suplementados com extrato de folhas de oliveira, evaporado e misturado à água, da cultivar Chemlali cultivadas na Tunísia.

## 5.7.2 Análises Bioquímicas

### 5.7.2.1 Glicose

Na tabela 13 estão apresentados os valores de glicose dos ratos submetidos às dietas experimentais. Observa-se que na glicemia de jejum, não ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado os grupos que ingeriram o extrato de oliveira com os grupos controles.

Tabela 13 - Glicose dos animais.

Grupos	Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )
NE	138±22,63 <sup>NS</sup>
N	137±9,27
HE	137±4,18
H	142±6,71

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste Tukey da análise de variância ( $p \leq 0,05$ ).

A *diabetes mellitus* é uma doença metabólica crônica que é causada pela falta absoluta ou relativa de insulina. Caracteriza-se por hiperglicemia, e a longo prazo ocasionam complicações que afetam os olhos, rins, nervos, pâncreas, sendo o transtorno endócrino mais comum. Porém, o mecanismo das complicações da doença não é claro, muita atenção foi dada ao papel do estresse oxidativo (CERIELLO, 2000; KAMTCHOUING et al., 2006). Sabe-se que muitos dos efeitos negativos do estresse oxidativo diminuem após a suplementação com certos antioxidantes dietéticos, como vitaminas e outros antioxidantes não nutrientes como os compostos fenólicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; DEMBITSKY et al., 2011; DEVALARAJA; JAIN; YADAV, 2011). No entanto, este efeito não foi possível observar no presente estudo, este fato pode ser justificado por ser utilizado o extrato na integralidade, diferente dos estudos abaixo listados que isolaram e utilizaram componentes específicos do extrato de folhas de oliveira.

Os antioxidantes naturais vem ganhando popularidade no tratamento da diabetes e em suas complicações, como estratégia para aliviar o dano oxidativo. Entre esses antioxidantes naturais, a oliveira tem se destacado como uma das espécies com a maior atividade antioxidante, devido à presença de compostos antioxidantes, como os polifenóis oleuropeína, hidroxitirosol e tirosol (VISIOLI et al., 2002).

Segundo Al-Azzawie; Alhamdani (2006), ao avaliarem a glicose no sangue de coelhos diabéticos tratados com oleuropeína, os níveis de glicose no sangue foram significativamente reduzidos após o início do tratamento, em comparação com o controle de coelhos diabéticos. O mesmo ocorreu no estudo realizado por Jemai; El Feki; Sayadi (2009), ao avaliarem a glicose de ratos diabéticos tratados com oleuropeína e hidroxitirosol, que após o tratamento, os níveis da glicose foram significativamente restaurados para

estabelecer valores que não eram diferentes do normal, como no grupo controle.

### **5.7.2.2 Perfil lipídico**

A dieta rica em colesterol induziu hipercolesterolemia que se manifestou na elevação de colesterol total (CT), das lipoproteínas de alta densidade (HDL), dos triglicérides (TAG) e das lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) (Tabela 14).

O colesterol desempenha várias funções essenciais no organismo, é componente das membranas celulares e precursor de sais biliares, hormônios e da vitamina D (CHAMPE et al., 2009). É sintetizado no fígado e excretado na circulação como componente das lipoproteínas, além de ser sintetizado no fígado, o colesterol é proveniente também da dieta. Por não ser considerado um nutriente essencial, não há nenhum requerimento de sua ingestão, pois o organismo é capaz de sintetizá-lo em quantidade suficiente (ARAÚJO, 2004). O consumo de colesterol deve ser inferior a 300 mg ao dia, e de 200 mg ao dia para pessoas com histórico de doenças cardiovasculares (SANTOS et al., 2013).

As lipoproteínas incluem quilomícrons, lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a lipoproteínas de alta densidade (HDL), que possuem a função de manter os lipídeos em solução durante seu transporte entre o sangue e os tecidos. Os quilomícrons são produzidos nas células da mucosa intestinal a partir de lipídeos da dieta e de lipídeos sintetizados nessas células (CHAMPE et al., 2009). O HDL é responsável por transportar o colesterol endógeno de volta para o fígado, retirando-o das paredes das artérias. Desta forma, um nível elevado de HDL indica baixa probabilidade do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (VILELA, 2007). O LDL, por sua vez, transporta cerca de 70% de todo o colesterol que circula no sangue e no fígado para os tecidos. São moléculas pequenas e densas que se ligam à membrana do endotélio. Concentrações plasmáticas elevadas de LDL estão associadas com doenças arteriais coronarianas, como a aterosclerose, patologia que ocorre quando o LDL permanece no sangue, acumulando-se nas paredes das artérias (SILVERTHORN, 2003).

O colesterol total e a fração LDL podem ser aumentados pela ingestão excessiva de calorias, gorduras saturadas e colesterol dietético. Inversamente, podem ser reduzidos por diminuição do peso corporal, substituição dietética dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos polinsaturados, fibra alimentar solúvel (ANDERSON, 1987) e pelo consumo de alguns alimentos com propriedade de diminuir o colesterol, como frutas e leguminosas (SHUTLER; LOW, 1988).

Tabela 14 - Perfil lipídico dos animais.

Grupos	CT (mg.dL <sup>-1</sup> )	HDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	TAG (mg.dL <sup>-1</sup> )	VLDL (mg.dL <sup>-1</sup> )
NE	141,36±9,25 <sup>NS</sup>	64,34±7,04ab <sup>1/</sup>	103,54±6,30b	20,71±1,26b
N	130,97±9,15	33,16±3,16b	107,40±9,41b	21,48±1,88b
HE	126,10±7,98	79,04±8,33a	358,96±8,88a	81,47±2,98a
H	145,94±7,23	62,43±1,80ab	338,54±6,25a	96,88±1,07a

<sup>NS</sup> Não significativo pelo teste Tukey da análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). <sup>1/</sup> Média ( $\pm$  desvio padrão) acompanhadas por mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em estudo realizado por Jemai et al. (2008), após induzirem hipercolesterolemia em ratos, observaram a elevação do CT, TAG e LDL. Ao administrar hidroxitirosol diminuiu significativamente os níveis séricos de CT, TAG e LDL e aumentou o nível sérico de HDL. O mesmo ocorreu em estudo realizado por Fki et al. (2005), no qual uma dieta rica em colesterol induziu a elevação de CT e LDL, e com a administração de extratos aquosos de frutos da oliveira, os níveis séricos de CT e LDL reduziram significativamente, ocorrendo também o aumento do nível sérico de HDL. Entretanto, no presente estudo não foi possível observar o mesmo efeito, o que demonstra que na concentração do extrato de folha de oliveira utilizado, os compostos extraídos que conferem o efeito protetor com relação aos lipídeos avaliados não foram efetivos, uma vez que não houve diferença significativa no perfil lipídico dos ratos que consumiram o extrato de folhas de oliveira quando comparados ao controle.

Apesar da maior parte dos dados encontrados na literatura demonstrarem uma possível tendência de redução de valores nos grupos que foram tratados com folhas de oliveira, ou alguns de seus constituintes químicos em comparação ao grupo controle, essa redução não foi comprovada estatisticamente no presente estudo. Este resultado pode ser explicado pela

concentração do extrato, já que foi utilizado a mesma concentração de chás comerciais, e em outros trabalhos pode ter sido utilizadas concentrações superiores, ou até mesmo um composto isolado das folhas de oliveira, como os polifenóis oleuropeína e hidroxitirosol. Dessa forma, sugere-se que mais estudos, com o intuito de investigar os componentes isolados da folha de oliveira e suas respectivas concentrações devam ser realizados, a fim de se elucidar com maior clareza a ação destes compostos no organismo.

### **5.7.2.3 Índice de Peroxidação Lipídica**

Na literatura científica está documentado que uma alta concentração de radicais livres na célula leva a reações em cadeia descontroladas e a peroxidação de lipídeos, resultando em várias condições patológicas que podem incluir aterogênese e câncer (MORA et al., 1990). Há relatos que a aterosclerose hipercolesterolêmica está associada com um aumento no nível do produto de peroxidação lipídica (TBARS). Assim, uma diminuição da peroxidação lipídica leva à redução de aterosclerose causada por hipercolesterolemia (PRASAD, 2009). Espécies Reativas de Oxigênio reagem com lipídios causando lipoperoxidação, com consequente formação de malondialdeído (MDA). Esta substância reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob aquecimento, formando um composto de coloração rosada, coloração esta que é proporcional à quantidade de malonaldeído formado (OHKAWA et al., 1979). O acúmulo de subprodutos, tais como o MDA é considerado um marcador do processo de oxidação no organismo, e a redução da peroxidação lipídica representa um mecanismo de proteção contra injúrias por estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007; HALLIWELL, 2011).

Na Figura 11 está apresentado o Índice de peroxidação lipídica dos órgãos coletados dos animais. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos NE, HE e H em relação ao índice de peroxidação lipídica do coração. No fígado, não houve diferença significativa entre os grupos NE, HE e H e entre os grupos NE, N e H. Nos rins não foi encontrada diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos NE, N e H, e entre os grupos HE e H.

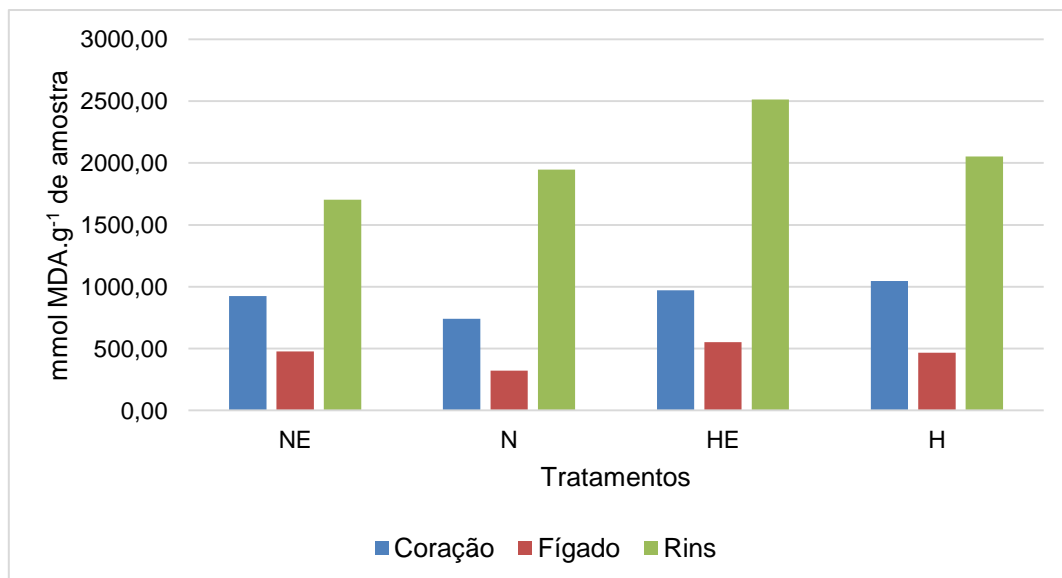


Figura 11 - Índice de peroxidação lipídica do coração, fígado e rins de ratos Wistar.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se constatar o efeito benéfico das folhas de oliveira em relação aos níveis de TBARS, comprovando o potencial antioxidante dos extratos das folhas de oliveiras em ensaios *in vivo*.

Observa-se que a dieta hiperlipídica induziu em danos oxidativos nos órgãos dos ratos, demonstrado pelo aumento da peroxidação lipídica. Este efeito também foi relatado por outros autores, que relacionaram o aumento da ingestão de colesterol com processos de peroxidação lipídica e elevação dos níveis de MDA, sugerindo que a hipercolesterolemia associa-se diretamente com a formação de radicais livres, e estes compostos poderiam promover injúria celular e, conseqüentemente, a disfunção endotelial, dando início a aterosclerose. Portanto, a redução da colesterolemia, influencia na redução do estresse oxidativo (LEVIN; KEESEY, 1998; PELLIZZON et al., 2007; BRESSAN et al., 2009). É importante ressaltar que a defesa antioxidante *in vivo* depende de mecanismos endógenos e da sua atuação sinérgica com antioxidantes exógenos, além disso, os valores de TBARS podem apresentar variabilidade entre os animais, e, fatores como a idade dos modelos biológicos podem interferir nos mecanismos de respostas adaptativas frente aos compostos antioxidantes da dieta (LIMA et al., 2000).

Em estudo realizado por Jemai et al. (2009), ratos diabéticos induzidos apresentaram danos hepáticos, os níveis de TBARS aumentaram

significativamente nos fígados dos ratos diabéticos comparados aos do grupo controle. Quando administrado oleuropeína e hidroxitirosol em duas doses diferentes, a concentração de TBARS reduziu significativamente.

Fki et al. (2005), obtiveram um aumento significativo nos níveis de MDA no fígado, coração e rins de animais alimentados com uma dieta rica em colesterol em comparação com a dieta do grupo controle. No grupo tratado com extratos dos frutos da oliveira, esse aumento foi significativamente reduzido. Os dados obtidos sugeriram que os compostos fenólicos presentes na azeitona podem ser capazes de diminuir ou abrandar os efeitos oxidativos.

Em outro estudo, o conteúdo de TBARS no fígado, coração e rim diminuiu significativamente quando o hidroxitirosol foi administrado em ratos hipercolesterolêmicos quando comparados com o grupo controle. Estes resultados sugeriram que o efeito hipolipemiante do hidroxitirosol pode ser devido às suas propriedades de diminuir os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e colesterol de lipoproteínas de baixa densidade, bem como para as suas atividades antioxidantes que impedem o processo de peroxidação lipídica (JEMAI et al., 2008).

A análise dos resultados apresentados evidenciou que mesmo não ocorrendo diferenças entre o ganho de peso e o consumo entre os grupos, a ingestão de extratos de folhas de oliveira resultou em melhoras no perfil lipídico e na lipoperoxidação dos órgãos, demonstrando a atividade biológica das folhas de oliveira. Evidenciando também que o tipo de dieta consumida é um fator de grande influência para o desenvolvimento de patologias, como as dislipidemias. Ainda permanece não esclarecido se o efeito hipolipidêmico das folhas de oliveira se deve a um único componente ou as interações entre os seus constituintes, evidenciando a necessidade de mais estudos para elucidar estas questões.

## 6 CONCLUSÕES

Os altos teores de fibras e de proteínas encontrados, sugerem que as folhas de oliveira podem servir como um suplemento alimentar. Os minerais predominantes nas folhas de oliveira foram o potássio e o cálcio, que são micronutrientes que desempenham importantes funções tanto no organismo humano, como no desenvolvimento da planta.

As folhas de oliveira apresentaram um alto conteúdo de compostos bioativos, principalmente de flavonoides e de carotenoides, e a partir da análise dos compostos fenólicos individuais, foi observado que as folhas de oliveira apresentam um maior conteúdo de rutina, campferol e tirosol. Indicando assim, que as folhas de oliveira, podem ser consideradas como uma fonte de compostos bioativos, com possível uso para alimentação animal e humana.

Devido à considerável atividade antioxidante, as folhas de oliveira das cultivares estudadas apresentam potencial para serem empregadas no desenvolvimento de produtos alimentícios, de forma a serem fonte natural de compostos bioativos e por representar uma alternativa para minimizar o descarte de resíduos ao meio ambiente.

Os resultados do presente estudo indicaram que extratos de folhas de oliveira apresentam potencial antibacteriano frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As folhas de oliveira apresentaram efeito bacteriostático frente as cepas, porém não apresentaram efeito bactericida na concentração avaliada. Assim, as folhas de oliveira tem potencial para serem utilizadas para controle antimicrobiano de alimentos, entretanto novos estudos devem ser realizados para adequação das concentrações frente aos agentes antimicrobianos.

Nas diferentes cultivares estudadas, foi encontrada diferença no conteúdo de umidade, lípidios, carboidratos, carotenóides, compostos fenólicos, flavonóides, taninos, compostos fenólicos individuais, bem como na atividade antioxidante e antimicrobiana.

A ingestão de extratos de folhas de oliveira resultou em melhoras no perfil lipídico e na lipoperoxidação dos órgãos de ratos Wistar, demonstrando o potencial na atividade biológica das folhas de oliveira. Sugerem-se mais pesquisas para elucidar se o efeito hipolipidêmico das folhas de oliveira se deve a um único componente ou as interações entre os seus constituintes.



## REFERÊNCIAS

ABBEDDOU, S.; RIHAWI, S.; HESS, H. D.; IÑIGUEZ, L.; MAYER, A. C.; KREUZER, M. Nutritional composition of lentil straw, vetch hay, olive leaves, and saltbush leaves and their digestibility as measured in fat-tailed sheep. **Small Ruminant Research**. v. 96, p. 126–135, 2011.

AGOSTINE-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina *versus* método do butanol ácido. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

AHMAD-QASEM, M. H.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; MULET, A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. **Food Research International**, v. 50, p. 189–196, 2013.

AL-AZZAWIE, H. F.; ALHAMDANI, M. S. S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v. 78, p. 1371-377, 2006.

ALIABADI, M.A.; DARSANAKI, R.K.; ROKHI, M.L.; NOURBAKHS, M.; RAEISI, G. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. **Annals of Biological Research**, v.3, n.8, p.4189-4191, 2012.

AMANI, J. et al. Detection of *E. coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR – ELISA. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 19, p. 278 – 284, 2015.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, C. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

ANDERSON, E L. et al. Pharmacokinetics of a single dose of rimantadine in young adults and children. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 31, n. 7, p.1140–1142, 1987.

ANDRIKOPOULOS, N.; ANTONOPOULOU, S.; KALIORA, A. Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet

aggregation induced by platelet-activating factor. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 35, p. 479-484, 2002.

AOAC. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **Association of Official Analytical Chemists International**, 2002.

AOAC. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **Association of Official Analytical Chemists International**, 2003.

ARAÚJO, J.M.A.; **Química de Alimentos: Teoria e pratica**. UFV, Viçosa. 3ª edição, 2004.

ARORA, D. S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. Internation. **Journal of Antimicrobials Agents**, v.12, p.257-262, 1999.

BAHLOUL, N.; KECHAOU, N.; MIHOUBI, N. B. Comparative investigation of minerals, chlorophylls contents, fatty acid composition and thermal profiles of olive leaves (*Olea europaeae* L.) as by-product. **GRASAS Y ACEITES**. v. 65, n. 3, July–September, 2014.

BALATSOURAS, G. Procesos de elaboración de las aceitunas de mesa. Em: **Enciclopedia Mundial Del Olivo**, Consejo Oleícola Internacional. Madrid: Plaza & Janés. p. 295-342, 1996.

BARTOLOMÉ, B.; JIMÉNEZ-RAMSEY, L. M.; BUTLER, L. G. Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. **Food Chemistry**, Barking, v.53, n.4, p.357-362, 1995.

BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, p. 457-462, 2000.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 57, n. 6, 2013.

BERTONCINI, E. I.; TERAMOTO, J. R. S.; PRELA-PANTANO, A. Desafios para produção de azeite no Brasil. **Infobibos**, 2010.

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

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2001.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3ª Ed., São Paulo: Livraria Varela, 2003.

BOUAZIZ, M.; SAYADI, S. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. **Eur J Lipid Sci Technol**. v. 107, p. 497–504, 2005.

BOUDHRIOUA, N.; BAHLOUL, N.; SLIMEN, I. B.; KECHAOU, N. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. **Ind.Crops Prod**. n. 29, p. 412–419, 2009.

BRAHMI, F.; MECHRI, B.; DABBOU, S.; DHIBI, M.; HAMMAMI, M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**. v. 38, p. 146– 152, 2012.

BRAHMI, F.; MECHRI, B.; DHIBI, M.; HAMMAMI, M. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. **Industrial Crops and Products**. v. 49, p. 256– 264, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSER, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 2, de 02 de janeiro de 2002**. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Brasília, DF: ANVISA, 2002. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm)>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H.H.M.; ZULET, M. A. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões

alimentares e fatores dietéticos específicos. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 53, p. 572-581, 2009.

BRITTON, G. UV/ visible spectroscopy. In: BRITTON, G. et al. (Eds). **Carotenoids, spectroscopy.** Birkhauser, 1995. v.1, p.13-62.

BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKANBERG, A. Determination of Iron-binding Phenolic groups in Foods. **Journal of Food Science**, v.56, n.1, p.128-131, 1991.

BUCHANAN, A. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technology**, v. 51, p. 69 – 76, 1997.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, v. 93, p. 223-226, 2005.

CAVALHEIRO, C. V.; ROSSO, V. D.; PAULUS, E.; CICHOSKI, A. J., WAGNER, R.; MENEZES, C. R.; BARIN, J. S. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1874-1879, out, 2014.

CAVALHEIRO, C. V.; PICOLOTO, R. S.; CICHOSKI, A. J.; WAGNER, R.; MENEZES, C. R.; ZEPKA, L. Q.; DA CROCE, D. M.; BARIN, J. S. Olive leaves offer more than phenolic compounds – Fatty acids and mineral composition of varieties from Southern Brazil. **Industrial Crops and Products**. n. 71, p. 122–127, 2015.

CEEA - Universidade Federal de Pelotas. Comissão de Ética em Experimentação Animal. Regimento da comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas [Internet]. Acesso em: 10 out. 2016. Disponível em: <http://wp.ufpel.edu.br/ceea/regimento/>

CERIELLO, A. Oxidative stress and glycemic regulation. **Metabolism**. v. 49, n. 2, p. 9-27, 2000.

CHAMPE, Pamela C.; HARVEY, Richard A.; FERRIER, Denise R. *Bioquímica ilustrada*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

CHATZISTATHIS, T.; THERIOS, I.; ALIFRAGIS, D.; DIMASSI, A. Effect of sampling time and soil type on Mn, Fe, Zn, Ca, Mg, K and P concentrations of olive (*Olea europaea* L., cv. 'Koroneiki') leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 126, p. 291-296, 2010.

CHEN, M. J. et al. Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. **Limnology**, v. 12, p. 187–192, 2011.

CHITARRA, M., I., F.; CHITARRA, A., B. **Pós-Colheita de Frutos e Hortalças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras, ESAL/FAEPE, 2005.

CINTRA, D.E.C.; COSTA, A.G.V.; PELUZIO, M.C.G.; MATTA, S.L.P.; SILVA, M.T.C.S.; COSTA, N.M.B. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout or chicken skin. **Nutrition**, n. 22, p. 197-205, 2006.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana. **CLSI documento M07-A06**, v. 23, n. 2, 2005a.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. **CLSI documento M100-S15**, v. 25, n. 1, 2005b.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos na experimentação animal [Internet]. [acesso em: 10 out. 2016]. Disponível em: <http://www.feis.unesp.br/Home/comissaodeeticaeusoanimal/principios-eticos-na-experimentacao-animal.pdf>

CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.

COUTINHO, E. F. **A cultura da Oliveira**. 1 ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007.

COUTINHO, E. F.; JORGE, R. O. Botânica e Morfologia da Oliveira. In: COUTINHO, E. F. (Org.). **A cultura da Oliveira**. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 19-29, 2007.

COUTINHO, E. F.; JORGE, R. O. Clima e Solo para Cultura da Oliveira. In: COUTINHO, E. F. (Org.). **A cultura da Oliveira**. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 31-38, 2007.

COUTINHO, E. F.; JORGE, R. O.; COSTA, V. B. Cultivares de Oliveira. In: COUTINHO, E. F. (Org.). **A cultura da Oliveira**. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 39-49, 2007.

CRM-AGRO MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA AGRICULTURA, PECUÁRIA E TOXICOLOGIA. Exercício Colaborativo CRM-Agro FT\_012016. Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Laboratório de Radioisótopos, Piracicaba, SP. 2016.

CRIADO, M. N. et al. Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Arbequina and Farga cultivars. **Food Chem.**, v. 100, p. 748-755, 2007.

DE VOS, R. C.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 778–791, 2007.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DEVALARAJA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 7, p. 1856-1865, 2011.

DOBRIAN, A.D.; DAVIES, M.J.; PREWITT, R.L.; LAUTERIO, T.J. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**. v. 35, n. 4, p. 1009-15, 2000.

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.

ERBAY, Z.; ICIER, F. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. **J. Food Eng.** n. 91, p. 533–541, 2009.

ESCOBAR, F. R. Fertilizacion del olivar. In: **Olivicultura: jornadas técnicas**. Barcelona: Fundación “la Caixa”/Agro Latino, p. 55-63, 1994.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FAO/OMS. **Human vitamin and mineral requirements**. In report of 7<sup>a</sup> Joint FAO/OMS Expert Conultation. Bangkok, Thailand, 2001. Xxii +286p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e00.HTM>>. Acesso em: 24/03/2016.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; RODRÍGUEZ, G.; RODRÍGUEZ, R.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ, A. Potential use of olive by-products, Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste, **Grasas y Aceites**, 57: 95-106, 2006.

FERNANDEZ-HERNANDEZ, A.; MATEOS, R.; GARCIA-MESA, J. A.; BELTRAN, G.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. Determination of mineral elements in fresh olive fruits by flame atomic spectrometry. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 4, p. 1183-1190, 2010.

FKI, I.; BOUAZIZ, M.; SAHNOUN, Z.; SAYADI, S. Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5362–5370, 2005.

FKI, I.; SAHNOUN, Z.; SAYADI, S. Hypocholesterolemic Effects of Phenolic Extracts and Purified Hydroxytyrosol Recovered from Olive Mill Wastewater in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 624-631, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

FUNAMOTO, Y.; YAMAUCHI, N.; SHIGENAGA, T., SHIGYO, M. Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p.163–170, 2002.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GOMES, F. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 537-548, set./out., 2007.

GOMEZ-CABRERA, A.; GARRIDO, A.; GUERRERO, J.; ORTIZ, V. Nutritive value of the olive leaf: effects of cultivar, season of harvesting and system of drying. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, n. 119, p. 205-210, 1992.

GUINDA, A. Use of solid residue from the olive industry. **Grasas Y Aceites**. 57:107-115, 2006.

GUTIÉRREZ, D. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8547–8554, 2012.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, n. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Science**, v. 32, n. 3, p. 125-129, 2011.

HAMDI, H. K., CASTELLON, R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 334, p. 769-778, 2005.



HENNEKINNE, J. A. et al. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**, v. 2, p. 2106 – 2116, 2010.

HERRERO, M. et al. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7511–7520, 2011.

HOFFMANN, J. F. et al. *Butia* spp.(Arecaceae) LC-MS-based metabolomics for species and geographical origin discrimination. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 2, p. 523-532, 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IMESP, p. 1020, 2008.

JEMAI, H.; FKI, I.; BOUAZIZ, M.; BOUALLAGUI, Z.; EL FEKI, A.; ISODA, H.; SAYADI, S. Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Its Triacetylated Derivative Recovered from Olive Tree Leaves in Cholesterol-Fed Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2630–2636, 2008.

JEMAI, H.; EL FEKI, A.; SAYADI, S. Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, p. 8798–8804, 2009.

KAMTCHOUING, P.; KAHPUI, M.S.; DZEUFIET, D.P.D. Antidiabetic activity of methanol/Methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on Streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** v.104, n. 3, p. 306- 309, 2006.

KIRITSAKIS, K. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. **J Am Oil Chem Soc.** v. 87, p. 369–376, 2010.

KRISTENSEN, M.; JENSEN, M.G.; AARESTRUP, J.; PETERSEN, K.E.N.; SONDERGAARD, L.; MIKKELSEN, M.S.; ASTRUP, A. Flaxseed dietary fibers lower cholesterol and increase fecal fat excretion, but magnitude of effect depend on food type. **Nutr Metab.** v. 9, p. 2-8, 2012.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: RiMa, p. 531, 2000.

LAYRISSE, M. New property of vitamin A and  $\beta$ -carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption. **Arch**, 2000.

LE TUTOUR, B.; GUEDON, D. Antioxidant activities of *Olea Europaea* leaves and related phenolic compounds, **Phytochemistry**, 31:1173-1178, 1992.

LEE, O. H. et al. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6107-6113, 2009.

LEE, O.H.; LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, v.101, p.3751–3754, 2010.

LEE, Y. J. et al. Effects of nitrogen status on leaf anatomy, chlorophyll content and canopy reflectance of paddy rice. **Bot. Stud.**, v. 52, p. 295–303, 2011.

LEVIN, B. E.; KEESEY, R. E. Defense of differing body weight set points in diet induced obese and resistant rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 274, p. 412-419, 1998.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, v. 148, p. 350-381, 1987.

Lima FEL, Menezes TN, Tavares MP, *et al.* (2000) Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Rev Nutr** **13**, 73-80.

LIMA, F.E.L.; MENEZES, T.N.; TAVARES M.P. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Rev Nutr**. v. 13, p. 73-80, 2000.

LUNKES, L. B. F.; HASHIZUME, L. N. Evaluation of the pH and titratable acidity of teas commercially available in Brazilian market. **RGO - Rev Gaucha Odontol.**, Porto Alegre, v. 62, n. 1, p. 59-64, jan./mar., 2014.

LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, S.; KWANSA, A. L. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. **J. Sci. Food Agric.** v. 86, p. 1350–1358, 2006.

MACHADO, L. M. M.; NASCIMENTO, R.; ROSA, G. S. Impacto do Processo de Secagem no Conteúdo de Compostos Bioativos Presentes nas Folhas de Oliveira (*Olea europaea*). In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis/SC. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2014.

MARTÍN-GARCÍA, A. I.; MOUMEN, A.; YÁÑEZ-RUIZ, D. R.; MOLINA-ALCAIDE, E. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. **Animal Feed Science and Technology**. n. 107, p. 61–74, 2003.

MARTÍN-GARCIA, A. I.; MOLINA-ALCAIDE, E. Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**. v. 142, p. 317–329, 2008.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MCCARRON, D. A.; REUSSER, M. E. Are Low Intakes of Calcium and Potassium Important Causes of Cardiovascular Disease?. **Am. J. Hypertension**. v. 14, p. 206–212, 2001.

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

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C.S.; VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, Buenos Aires, v.40, p.223-231, 2006.

MORITA, K.; OGATA, M.; HASEGAWA, T. Chlorophyll derived from Chlorella inhibits dioxin excretion in rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 289–294, 2001.

MUKHOPADHYAY, S.; LUTHRIA, D. L.; ROBBINS, R. J. Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. **J. Sci. Food Agric**. v. 86, p. 156–162, 2006.

MUNIZ, L.C.; SCHNEIDER, B.C.; DA SILVA, I.C. M; MATIJASEVICH, A.; SANTOS, I.S. Accumulated behavioral risk factors for cardiovascular diseases in Southern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 3, p. 534-542, 2012.

MUÑOZ-OLIVAS, R.; CAMARA, C. 2001. Speciation related to human health. In: Ebdon, L., Pitts, L., Cornelis, R., Crews, H., Donard, O.F.X., Quevauviller, P. (Eds.), Trace Element Speciation for Environment, Food and Health. **The Royal Society of Chemistry**, p. 331-353. Cambridge: United Kingdom.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromat. A.**, Washington, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Polifenóis da madeira de *Eucalyptus grandis*. Parte 1: análise por espectroscopia e cromatografia líquida. **Ciência e Engenharia**, v. 5, n. 2, p.13-18, 1996.

NAVARRO, C; PARRA, M. Á. Plantación. In: BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. F. **El cultivo del olivo**. 6. ed. Madri: Mundi-Prensa, p. 93-125, 2008.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. DE. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, p. 1451–1474, 2013.

NOGUEIRA, F. A. M. **Contribuição para caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: Aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos**. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança, 2012.

OLIVEIRA, A. F.; ABRAHÃO E. Botânica e morfologia da oliveira (*Olea europaea* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 231, p. 13-17, 2006.

OLIVEIRA, F. M.; ANTUNES, B. F; JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Teor de clorofila em folhas de oliveira cultivadas na região da campanha gaúcha. In: **15ª Mostra da Produção Universitária - MPU Rio Grande/RS, Brasil**, ISSN: 2317-4420, 2016.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 881, n. 1, p. 543-555, 2000.

OLSON, J. A. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos Nutrición**, v. 49, n.1, p.7-11, 1999.

ORAK, H. H.; ISBILIR, S. S.; YAGAR, H. Determination of Antioxidant Properties of Lyophilized Olive Leaf Water Extracts Obtained from 21 Different Cultivars. **Food Sci. Biotechnol.** v. 21, n. 4, p. 1065-1074, 2012.

PACETTA, C. F. **Oliveira a árvore da vida**. Vida e Consciência Editora, ISBN 978-85-90717, 2007.

PACETTA, C. F. **Estudo de diferentes metodologias para obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo Oleuropeína**. 2013. 82f. Dissertação (Mestrado Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

PEDROZA, S. S. S. **Análise dos componentes do Azeite utilizando Método Quimiométricos**. 2010. 115f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Alimentar) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemistry Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-379, 1998.

PELLIZZON, M. A; BILLHEIMER, J. T.; BLOENDON, L.T. Flaxseed reduces plasma cholesterol levels in hypercholesterolemic mouse models. **J Am Col Nutr.**, v. 26, p. 66-75, 2007.

PEREIRA, J.A.; PEREIRA, A.P.G.; FERREIRA, I.C.F.R.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem**, v.54, p.8425-8431, 2006.

PEREIRA, A.P.; FERREIRA, I.; MARCELINO, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa). **Leaves Molecules**, v.12, p.1153-1162, 2007.

PETRY, C.J.; OZANNE, S.E.; WANG, C.L.; HALES, C.N. Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. **Horm Metab Res.** v. 32, n. 6, p. 23-39, 2000.

POUDYAL, H.; CAMPBELL, F.; BROWN, L. Olive Leaf Extract Attenuates Cardiac, Hepatic, and Metabolic Changes in High Carbohydrate-, High Fat-Fed Rats<sup>1-3</sup>. **The Journal of Nutrition**. v. 140, p. 946–953, 2010.

PRASAD, K. Flaxseed and cardiovascular health. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.54, n. 5, p. 369-377, 2009.

PRASAD, K.; BISHT, G. Evaluation of nutritive, antioxidant and mineral composition of Pavetta indica Linn. leaves. **Res. J. Phytochem**. v. 5, p. 54–59, 2011.

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER L. G. A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 26, n.5, p. 1214-1218, 1978.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN- CALDENTEY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **J. Appl.Microbiol**, v.90, p.494-507, 2001.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização Dos Taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n.4, p.485-492, 2002.

QUIRANTES-PINÉ, R. et al. HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 213–223, 2012.

QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis** , v. 19, p. 97-111, 2006.

RAI, M. et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, 2017.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent diet. **J. Nutr.**, n. 123, p. 1939-1951, 1993.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher: Instituto Maua de Tecnologia, 2007.

RIEDIGER, N. D.; OTHMAN, R.; FITZ, E.; PIERCE, G. N.; SUH, M.; MOGHADASIAN, M. H. Low n-6:n-3 fatty acid ratio, with fish- or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. **Eur J Nutr.** v. 47, p. 153-160, 2008.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAW, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Burjassot, v.2, p.127-149, 1988.

RODRIGUES, M. Â.; Correia, C. M. **Manual da safra e contra safra do olival**. Bragança. Instituto Politécnico de Bragança, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. **Washington DC: Usaid-Omni**, p. 88, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoids analysis in foods. **ILSI Press: Washington**, p. 64, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. **ILSI Press**. USA, 2001.

ROIG, A.; CAYUELA, M. L.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods, **Waste Management**, n. 26, p. 960–969, 2006.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO. C. DE G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Comunicado Técnico on line 127, EMBRAPA. **Metodologia Científica**:

**Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH.** Fortaleza, CE, 2007.

SAHAN, Y.; BASOGLU, F.; GUCER, S. ICP-MS analysis of a series of metals (namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 395–399, 2007.

SANTOS R.D., GAGLIARDI A.C.M., XAVIER H.T., MAGNONI C.D., CASSANI R., LOTTENBERG A.M. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(1Supl.3):1-40.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SEABRA, R. M.; VINHA, A. F.; FERRERES, F.; SILVA, B. M.; VALENTÃO, P.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. B.; ANDRADE, P. B. Phenolic profiles of portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. **Food Chem**. v. 89, p. 561–568, 2005.

SHUTLER, S. M.; LOW, A. G.; Walker, A. F. Influence of baked beans on plasma lipids in pigs fed on a hypercholesterolaemic diet. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 47, n. 97, 1988.

SILVA, E. D.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. D. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ZILSE, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v.36, n.5, p.1-6, 2013.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Rev. Nutr.** Campinas, v. 12, n. 1, p. 5-19, 1999.

SIMÓN, B. F.; CADAHIA, E.; CONDE, E. Evolution of phenolic compounds of Spanish oak wood during natural seasoning. First results. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p.1687-1694, 1999.

SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H. Plant phenolic. Em: SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Rev. Nutr.** Campinas, v. 12, n. 1, p.5-19, 1999.



SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Viticult.**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R., SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chem.**, Davis, v. 89, n. 4, p. 191-198, 2005.

SLUIS, A. A. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: EMATER/RS - ASCAR, p. 222, 2008.

STREIT, M. N. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.  
TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 820, 2004.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; MATHÉ, G. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.

TEIXEIRA, M. L.; SOARES, A. R.; SCOLFORO, J. R. S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em 10 locais de Minas Gerais. **Ciência Prática**, v. 14, n. 2, p. 229-232, 1990.

TERAMOTO, J. R. S. 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, 2017.

VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 664-668, 2004.

VILELA, A. L. M. **O colesterol. Atividade física humana**, São Paulo, v. 1, n. 1, jan./abr. 2007.

VISIOLI, F.; GALLI, C. Biological properties of olive oil phytochemicals. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 42, n. 3, p. 209-221, 2002.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, Cap. 10, p. 782-799, 2000.

XIE, P. et al. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea L.*) extracts and their structure–activity relationships. **Journal of Functional Foods**. v. 16, p. 460–471, 2015.

YANCHEVA, S.; MAVROMATIS, P.; GEORGIEVA, L. Polyphenol profile and antioxidant activity of extracts from olive leaves. **Journal of Central European Agriculture**, v. 17, n. 1, p. 154-163, 2016.