



NAIARA APARECIDA FRANCO BARONI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*
DE AZEITES DE OLIVA IDENTIFICADOS COMO EXTRA VIRGEM
PRODUZIDOS NO BRASIL

CAMPINAS

2015

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NAIARA APARECIDA FRANCO BARONI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*
DE AZEITES DE OLIVA IDENTIFICADOS COMO EXTRA VIRGEM
PRODUZIDOS NO BRASIL

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição, na área de concentração Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Macedo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA NAIARA APARECIDA
FRANCO BARONI, E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. JULIANA ALVES MACEDO.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

B268a Baroni, Naiara Aparecida Franco, 1987-
Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de azeites de oliva identificados como extra virgem produzidos no Brasil / Naiara Aparecida Franco Baroni. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Juliana Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Azeite de oliva. 2. Capacidade antioxidante. 3. Compostos bioativos. I. Macedo, Juliana Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of *in vitro* antioxidant potential of olive oils identified as extra virgin produced in Brazil

Palavras-chave em inglês:

Olive oil

Capacity antioxidant

Bioactive compounds

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Hélia Harumi Sato

Data de defesa: 29-05-2015

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo

Membro Titular

Universidade Estadual de Campinas

Dr^a. Ana Lúcia Tasca Goiz Ruiz

Membro Titular

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,
Biológicas e Agrícolas - CPQBA

Prof^a. Dr^a. Hélia Harumi Sato

Membro Titular

Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Dr^a. Priscila Becker Siqueira

Membro Suplente

Universidade Federal de Mato Grosso

Dr. Renato Grimaldi

Membro Suplente

Universidade Estadual de Campinas

ABSTRACT

The extra virgin olive oil is considered a functional food with important biological properties related to the high concentration of monounsaturated fatty acid. Recent studies indicate that minor components in olive oil composition have been very associated with health benefits, far beyond the content of oleic acid, highlighting the phenolic compounds, especially hydroxytyrosol and tyrosol. The region where the olive trees are grown may have direct influence on oil composition, especially with regard to minority compounds. The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential of olive oils produced in Brazil (ArbequinaRS, ArbequinaMG and Maria da Fé) is similar to European oil (ArbequinaMed and Gallo®) traditional in the Brazilian market. The fatty acid profile showed that the sample Maria da Fé resembles the reference sample Gallo®, with the highest concentrations of oleic acid. The tocopherols content was higher in ArbequinaRS and Maria da Fé samples. The determination of total phenolic by the Folin-Ciocalteu method, the highlights were the ArbequinaRS and ArbequinaMed. This also showed a higher concentration of hydroxytyrosol, while the Gallo® reference showed greater tyrosol content. The antioxidant capacity was evaluated by sequestration methods of radicals, ORAC and DPPH, this allowed us to identify significant differences between the samples tested. Among the samples of Arbequina variety, stand out from the oil produced in southern Brazil, equating statistically the trade of Mediterranean origin; was observed a positive correlation between total phenolic content and antioxidant activity by DPPH radical sequestration method. The ORAC method was not significantly different between the samples. The biological activity was evaluated by measuring the activity of endogenous enzymes of the antioxidant arsenal of human hepatocytes: superoxide dismutase and catalase. After the MTT assay cell viability was defined two concentrations to study enzyme tests 0,5 and 2 mg/mL. In general, the antioxidant endogenous cellular system hepatocyte activation assays, among the oils tested the highest biological potential were Brazilians, with major emphasis on the Arbequina variety produced in Rio Grande do Sul, ArbequinaRS.

Keywords: olive oil, antioxidant potential, bioactive compounds.

RESUMO

O azeite de oliva virgem extra é considerado um alimento funcional com importantes propriedades biológicas relacionadas à elevada concentração de ácido graxo monoinsaturado. Estudos recentes indicam que os componentes minoritários na composição do azeite têm sido associados com benefícios à saúde, muito além do conteúdo de ácido oleico, destacando-se os compostos fenólicos, principalmente hidroxitirosol e tirosol. A região na qual as oliveiras são cultivadas pode ter influência direta na composição do azeite, principalmente no que se refere aos compostos minoritários. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o potencial antioxidante dos azeites de oliva produzidos no Brasil (ArbequinaRS, ArbequinaMG e Maria da Fé) se assemelha ao dos azeites europeus (ArbequinaMed e Gallo[®]) tradicionais no mercado brasileiro. O perfil de ácidos graxos mostrou que a amostra Maria da Fé assemelha-se à amostra referência Gallo[®], apresentando as maiores concentrações de ácido oleico. O teor de tocoferóis foi maior nas amostras ArbequinaRS e Maria da Fé. Quanto à determinação de fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, destacaram-se a ArbequinaRS e ArbequinaMed. Esta também apresentou maior concentração de hidroxitirosol, enquanto que, a referência Gallo[®] apresentou maior teor de tirosol. A capacidade antioxidante foi avaliada por métodos de sequestro de radicais, ORAC e DPPH, este permitiu identificar diferença estatística entre as amostras testadas. Dentre as amostras de variedade Arbequina, destaca-se o azeite produzido na região Sul do Brasil, equiparando-se estatisticamente ao comercial de origem mediterrânea; foi observada uma correlação positiva entre conteúdo de fenólicos totais e a capacidade antioxidante pelo método de sequestro de radical DPPH. O método ORAC não mostrou diferença estatística significativa entre as amostras. A atividade biológica foi avaliada através da mensuração da atividade de enzimas endógenas, catalase e superóxido dismutase, do arsenal antioxidante de hepatócitos humanos. Após o ensaio MTT de viabilidade celular foram definidas duas concentrações de estudo para os testes enzimáticos: 0,5 e 2mg/mL. De forma geral, nos ensaios de ativação do sistema celular endógeno antioxidante de hepatócitos, dentre os azeites testados os de maior potencial biológico foram os brasileiros, com importante destaque para a variedade Arbequina produzida no Rio Grande do Sul, ArbequinaRS.

Palavras chave: azeite de oliva, potencial antioxidante, compostos bioativos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVO	5
2.1 Objetivos específicos	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 O azeite de oliva e sua caracterização química	7
3.2 Categorias de azeite de oliva: processamento e parâmetros de qualidade	9
3.3 Produção e tendência de mercado do azeite de oliva	12
3.4. Atividade biológica de compostos químicos do azeite de oliva extra virgem....	16
3.4.1 Composição em ácidos graxos	16
3.4.2 Pigmentos: clorofila e carotenoides totais	18
3.4.3 Tocoferóis e tocotrienóis	19
3.4.4 Compostos fenólicos	20
3.4.4.1 Compostos fenólicos: metabolismo.....	21
3.4.4.2 Compostos fenólicos: atividade biológica <i>in vitro</i>	22
3.5 Equilíbrio redox e sistema de defesa celular endógeno contra espécies reativas	24
3.5.1 Catalase	26
3.5.2 Superóxido Dismutase - SOD	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Amostras	29
4.2 Caracterização química dos compostos bioativos	29
4.2.1 Determinação de ácidos graxos	29
4.2.2 Determinação de pigmentos	31
4.2.3 Determinação de tocóis	32
4.2.4 Conteúdo de fenólicos totais	32
4.2.5 Identificação e quantificação dos principais fenólicos de interesse.....	33
4.3 Avaliação da atividade antioxidante por sequestro de radicais livres	34
4.3.1 ORAC	34
4.3.2 Ensaio DPPH	35

4.4 Cultivo celular	36
4.4.1 Avaliação da viabilidade celular em linhagens HT29 e HepG2	36
4.4.2 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes em hepatócitos humanos	37
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 Caracterização das amostras	39
6.1.1 Caracterização do perfil de ácidos graxos	39
6.1.2 Determinação de pigmentos: carotenóides e clorofila totais	43
6.1.3 Caracterização e quantificação de tocoferóis	45
6.1.4 Determinação de fenólicos totais	46
6.1.5 Análise cromatográfica de fenólicos: tirosol e hidroxitirosol	49
6.2 Avaliação da atividade antioxidante por sequestro de radicais livres	51
6.2.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC	52
6.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH	54
6.3 Ensaio celulares	57
6.3.1 Avaliação da viabilidade celular	57
6.3.2 Avaliação da capacidade de modulação da atividade enzimática	61
7. CONCLUSÃO	67
8. SUGESTÕES DE ESTUDOS FUTUROS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Epígrafe

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

Guimarães Rosa

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe que sempre foi meu apoio e incentivo, e a todos os professores que me inspiram em seguir a carreira acadêmica.

Agradecimentos

À Deus por me guiar nas minhas escolhas, e dar força nos dias difíceis.

À minha mãe, minha família e exemplo, que mesmo em silêncio sempre me deu força e incentivo a continuar em busca dos meus objetivos.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Macedo, pela confiança e pelos momentos de compreensão e apoio, pelos abraços e serenidade na orientação.

Ao Laboratório de Compostos Bioativos, especialmente, às amigas Vânia, Andréa e Tati.

Vânia, pelo seu exemplo de integridade, comprometimento e responsabilidade; e ainda pelos ensinamentos de uma verdadeira educadora. Andréa, pela parceria, pelos conhecimentos compartilhados, e risadas que tornavam os dias mais alegres e divertidos. Tati, a IC que todo mundo gostaria de ter, obrigada pela ajuda, pelo carinho, pelos deliciosos muffins que faziam os dias mais doces.

Às amigas Érica, Juliane e Ana Paula, agradeço a feliz coincidência de termos nos encontrado pela FEA. Obrigada pela troca que pudemos realizar no âmbito da pesquisa, e principalmente, pela confiança e cumplicidade.

Ao Laboratório de Bioquímica pelo suporte com os equipamentos e materiais, a todos o alunos, técnicos e à Prof^a. Dr^a. Gabriela que de alguma forma auxiliaram na execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Óleos e Gorduras pela atenção ofertada e acompanhamento nas análises químicas.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pelas valiosas sugestões no projeto e para a minha formação, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia, Dr. Renato, Prof^a. Dr^a. Priscila e Prof^a. Dr^a. Hélia.

Ao CPQBA, especialmente à Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia por ceder a linhagem celular, pelos conhecimentos compartilhados, e por ser a gentileza em pessoa.

A EPAMIG e à Empresa Olivas do Sul por disponibilizarem as amostras de azeite de oliva produzidas no Brasil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

Aos funcionários do DEPAN que foram muito importantes durante todo o período do mestrado. E, por fim, agradeço também a todos que, mesmo não tendo sido citados, colaboraram para a realização deste trabalho e para que eu pudesse chegar até aqui.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais compostos químicos no azeite de oliva extra virgem com propriedades biológicas, agrupados por categorias	8
Figura 2. Produção mundial de azeite de oliva (milhares de toneladas)	12
Figura 3. Ranking (em percentagem) dos países que exportaram azeite de oliva ao Brasil...	14
Figura 4. Estrutura química dos principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva	17
Figura 5. Estrutura química dos principais compostos fenólicos, com atividade biológica, identificados no azeite oliva extra virgem	21
Figura 6. Viabilidade celular, expressa em percentagem, da linhagem celular HepG2 após 5 h de exposição das amostras nas concentrações de 0,5 a 3mg/mL	60
Figura 7. Atividade de catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) nas concentrações de 0,5 e 2 mg/mL	62
Figura 8. Atividade de SOD (% inibição/mg proteína) nas concentrações de 0,5 e 2mg/mL	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes variedades de azeitona e sua respectiva origem	15
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (% área relativa) de amostras de azeite de oliva identificadas como extra virgem	40
Tabela 3. Conteúdo de pigmentos em azeites de oliva extra virgem, expresso em mg/kg de amostra	43
Tabela 4. Conteúdo de α - tocoferol expresso em mg /kg de amostra.....	45
Tabela 5. Conteúdo de fenólicos totais expressos em mg de ácido gálico equivalente/Kg de amostra (mg AGE /kg)	47
Tabela 6. Concentração de fenólicos tirosol e hidroxitirosol, em amostras de azeite de oliva, expressa em mg de fenólico /kg de amostra	49
Tabela 7. Equivalentes Trolox ($\mu\text{mol/g}$ amostra) e faixas de linearidade para as concentrações de 5 a 20 mg/mL	52
Tabela 8. Equivalentes Trolox ($\mu\text{mol/g}$ amostra) pelo método DPPH	54
Tabela 9. Viabilidade celular, expressa em porcentagem, da linhagem HT29 (adenocarcinoma coloretal humano) após exposição aos diferentes sistemas de emulsificação por 5 horas	57

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

($\cdot\text{O}_2^-$) - ânion superóxido

($\cdot\text{OH}$) - radical hidroxil

($\text{OH}^\cdot$) - radical peroxil

3,4-DHPEA - hidroxitirosol

3,4-DHPEA-EDA - hidroxitirosol dialdeído

AGE - Ácido Gálico equivalente

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCS - American Oil Chemists' Society

APPH - dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)

Arbequina Med - variedade Arbequina do Mediterrâneo

Arbequina MG - variedade Arbequina De Minas Gerais

Arbequina RS - variedade Arbequina do Rio Grande do Sul

BSA - *Bovine Serum Albumin* - albumina do soro bovino

CAT - Catalase

COX₁ e COX₂ - cicloxigenases 1 e 2

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO - dimetil sulfóxido

DPPH - 1,10-difenil-2-picrilhidrazil

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

FAMES - *Fatty Acid Methyl Ester* - ésteres metílicos dos ácidos graxos

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HepG2 - células de hepatoma humano

HT29 - células de adenocarcinoma de cólon humano

IL7 - interleucinas da série 7

IOOC - *International Olive Oil Council*

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LTB₄ - leucotrienos da série 4

MEM - *Minimum Essential Medium*

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MUFAs - *Monounsaturated Fat Acids*

NCI/ NIH - *National Cancer Institute at the National Institutes of Health*

ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

p-HPEA - tirosol

p-HPEA-EDA - tirosol aldeído

PUFAs - *Polyunsaturated Fat Acids*

RNS - *Reactive Nitrogen Species* - Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS - *Reactive oxygen species* - Espécies Reativas de Oxigênio

SOD - superóxido dismutase

TXB₂ - tromboxanos

UE - União Europeia

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de oliveiras (*Olea europaea* L.), tradicionalmente estabelecido em países do Mediterrâneo, tem sido estendido para muitas outras partes do mundo. O processo industrial para obtenção do azeite de oliva inclui apenas operações físicas a partir dos frutos da oliveira, com exclusão dos óleos extraídos com uso de solventes, processo de reesterificação, ou de qualquer mistura com outros tipos de óleo (ESPÍNOLA et al., 2009; BOSQUE-SENDRA, 2011).

O azeite de oliva é um produto importante na economia Mediterrânea, caracterizado como a principal fonte de lipídeos, desde a antiguidade, e um componente característico da chamada “Dieta Mediterrânea”. Embora tenha uma longa história de comércio a nível mundial, o seu consumo ainda tem sido realizado principalmente pelos países mediterrâneos, os principais produtores, cuja ingestão dietética varia entre 25 a 50 mL por dia (CICERALE, LUCAS e KEAST, 2010; SCHEIDEL e KRAUSMANN, 2011; BAYRAM et al., 2012; MALHEIRO et al., 2012).

Malheiro et al. (2012) complementam que os componentes bioativos preservados no azeite extra virgem, como os polifenóis e outros compostos minoritários, têm sido associados com benefícios à saúde. Destacando-se os compostos fenólicos, principalmente oleuropeína, hidroxitirosol e tirosol, os quais parecem ajudar a reduzir o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas por atuarem como fortes antioxidantes.

Estudos apontam a baixa prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, em países da região Mediterrânea em comparação a outras partes do mundo. Neste sentido, diversos estudos buscam relacionar a ingestão regular de azeite de oliva, e seus componentes com efeito protetor, como parte bioativa da dieta mediterrânea tradicional (SCODITTI et al.; 2014).

Há relatos na literatura sobre o azeite de oliva apresentar diferentes atividades biológicas, tais como potencial antioxidante, anti-inflamatório, antiaterogênico, anticâncer, antidiabético e neuroprotetora. O azeite de oliva tem um alto conteúdo de ácido oleico (ácido graxo monoinsaturado), mas também contém compostos minoritários como tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína e seus derivados, para os quais já foram relatados resultados promissores como agentes antibacterianos, antivirais, e antiparasitários, principalmente em

estudos *in vitro*. Pesquisas recentes enfatizam os efeitos de alguns componentes minoritários do azeite de oliva, muito além do ácido oleico, na prevenção de doenças cardiovasculares. Assim, está claro, para muitos pesquisadores do assunto, que apenas o conteúdo de ácido oleico não pode explicar totalmente o impacto do azeite de oliva na saúde e, que o azeite de oliva virgem é rico em compostos minoritários com relevantes funções fisiológicas e farmacológicas (PERONA et al., 2006; CICERALE, LUCAS e KEAST, 2010; RUIZ-CANELA e MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2011).

A composição e o conteúdo de compostos fenólicos do azeite de oliva extra virgem depende de diferentes fatores, segundo Bayram et al. (2012), como a variedade e grau de maturação da oliva, condições climáticas e fatores agrônômicos e tecnológicos de processamento. Dessa forma, a região na qual a oliveira é cultivada pode ter influência direta na composição do azeite produzido, principalmente no que se refere aos compostos minoritários. Neste sentido, pode-se questionar se a potencial atividade dos azeites depende, dentre outros fatores, da região de cultivo da matéria prima.

A monocultura do azeite está se espalhando para países onde não havia tradição em sua produção, muito em função da crescente demanda de consumo associada ao apelo dos benefícios para saúde relacionados à “Dieta do Mediterrâneo”. No Brasil, a oliveira foi introduzida há vários séculos e em quase todos os estados da Federação, porém com maior frequência nas regiões Sul e Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Atualmente, existem áreas com plantios comerciais nos estados do Rio Grande do Sul (Bagé, Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Dom Pedrito, Encruzilhada do Sul, Rio Grande, Santana do Livramento e Vacaria), Minas Gerais (Maria da Fé) e em Santa Catarina devido aos esforços de adequação de técnicas de cultivo de oliva e processamento do azeite (BALLUS, 2010; EMBRAPA, 2011).

Assim, justifica-se investigar se o potencial antioxidante dos azeites de oliva produzidos no Brasil se assemelha ao potencial antioxidante dos azeites produzidos em Portugal e Espanha, países historicamente tradicionais na olivicultura, considerando a possível variação na composição de compostos minoritários pela região de produção de oliva.

Conforme esclarecido pela EMBRAPA Clima Temperado (2014), as áreas de cultivo brasileiras e europeias são bem diferentes em função do solo e, considerando-se ainda,

todas as demais variáveis abordadas neste trabalho que podem influenciar na composição química e qualidade do azeite de oliva, espera-se observar diferenças quanto à atividade antioxidante entre os azeites brasileiros e os azeites importados. E, mais especificamente entre as amostras da mesma variedade, Arbequina, de origens diferentes.

Castelo-Branco e Torres (2011) explicam que atividade dos compostos antioxidantes depende de diversos fatores físico-químicos, como por exemplo, interações entre os compostos antioxidantes, e destes com outros componentes do meio, como ácidos graxos quimicamente ligados a fosfolipídios ou triacilgliceróis. Neste sentido, a fim de manter as interações químicas entre os compostos de caráter mais apolar e polar do óleo, escolhemos conduzir os ensaios biológicos com os azeites em sua forma íntegra, e não apenas de uma fração ou composto isolado.

O propósito deste estudo foi comparar a ação antioxidante de azeites de oliva extra virgem produzidos no Brasil, com potencial de mercado, e duas marcas de azeites comerciais. Uma das marcas de caráter monovarietal Arbequina, variedade de origem mediterrânea amplamente cultivada nas diferentes regiões produtoras do Brasil; a outra marca denominada Gallo[®] se caracteriza como um dos azeites mais populares no mercado brasileiro, cuja origem é Portuguesa.

2. OBJETIVO

Avaliar se os azeites de oliva extra virgem produzidos no Brasil, em fase de aperfeiçoamento e início de comercialização, apresentam a mesma capacidade antioxidante que os azeites importados, proveniente da região do Mediterrâneo ou de Portugal, regiões tradicionais no comércio de azeite no mercado brasileiro.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar os compostos antioxidantes das amostras de azeites brasileiros e de duas marcas europeias tradicionais no mercado nacional.
- Avaliar a capacidade antioxidante das amostras de azeite de oliva identificados como extra virgem via sequestro de radicais livres (ORAC e DPPH).
- Avaliar as concentrações das amostras de azeite de oliva identificados como extra virgem que não apresentem toxicidade em células de cultura de hepatócitos humanos.
- Avaliar o potencial antioxidante das amostras de azeite de oliva identificados como extra virgem por indução das enzimas antioxidantes endógenas de hepatócitos humanos.
- Comparar os resultados das análises considerando a variedade da oliva e a origem de cultivo das diferentes amostras estudadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O azeite de oliva e sua composição química

A oliveira (*Olea europaea* L.) é classificada na família botânica Oleaceae, que pertence à Angiosperma. O nome oliva é derivado da antiga palavra grega *élaia* (*elaia*), e posteriormente a palavra latina *ólea*. Palavras derivadas significando ‘óleo’ em ambas as línguas foram *élaion* (*elaion*) e *oleum*, respectivamente. A oliveira parece ser nativa da região oriental do Mediterrâneo, e de lá, se espalhou para toda a Bacia do Mediterrâneo, o Mar Negro, e Golfo Pérsico durante a Era Neolítica. No Brasil a oliveira foi introduzida por imigrantes europeus por volta de 1820, e no sul de Minas Gerais a partir de 1955 por produtores locais (OLIVEIRA et al., 2012; MATEU-DE- ANTONIO e MARÍN-CASINO, 2013).

A legislação brasileira (RDC 270) define como azeite de oliva o produto obtido exclusivamente dos frutos da oliveira (*Olea europaea* L.), não sendo considerados como azeites os óleos obtidos através da extração com uso de solventes ou processos de reesterificação e/ou qualquer mistura de outros óleos. Desta forma o azeite de oliva virgem pode ser produzido somente a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), através de processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições térmicas que não produzam alteração do azeite, e sem a utilização de outros tratamentos, além de lavagem, decantação, centrifugação e filtração (ANVISA, 2005).

A composição química do azeite de oliva extra virgem pode ser muito variável, e depende de diferentes fatores como: condições climáticas, solo e condições de cultivo (colheita e maturação), condições agronômicas (irrigação, fertilização), variedade de oliva, idade da planta, transporte e condições de armazenamento, métodos adequados de extração. (POULIAREKOU et al., 2011; CAPONIO et al., 2013).

Lozano-Sánchez et al. (2010) afirmam que o azeite de oliva pode ser dividido em fração minoritária (ou insaponificável) e majoritária (ou saponificável) com base na sua composição química. Os componentes majoritários, os quais incluem triacilgliceróis, representa 97 a 99% da massa total de óleo. Entre os ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oleico é o ácido graxo majoritário (EPAMIG, 2008).

A partir do metabolismo secundário da oliveira formam-se os componentes minoritários do azeite que compreendem de 1–3% de sua composição, havendo controvérsias nessa proporção, há alguns autores que citam de 0,5–1%, dependendo de várias condições. Os compostos minoritários compreendem mais de 300 compostos químicos diferentes, incluindo: hidrocarbonetos, fosfatídeos, esteróis, tocoferóis (vitamina E), vitaminas lipossolúveis (A, D e K), pigmentos (responsáveis pela cor verde: clorofila; e amarela: caroteno); voláteis (responsáveis pelo odor do azeite); e polifenóis (responsáveis pelo sabor amargo ou picante) (EPAMIG, 2008; LOZANO-SÁNCHEZ et al. 2010; MATEU-DE-ANTONIO e MARÍN-CASINO, 2013). A Figura 1 relaciona os principais compostos minoritários presentes no azeite de oliva extra virgem que apresentam atividade biológica segundo a literatura especializada.

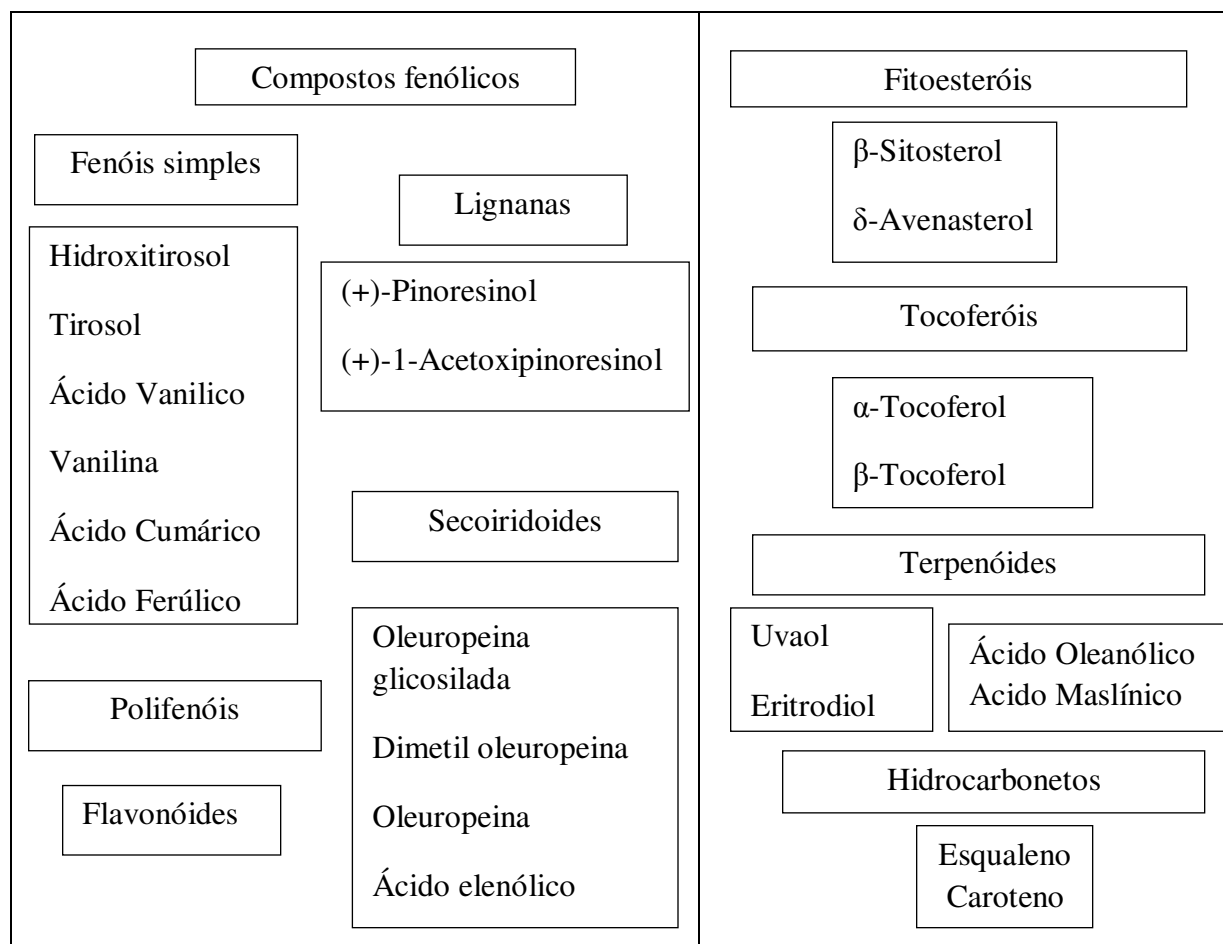


Figura 1: Principais compostos químicos no azeite de oliva extra virgem com propriedades biológicas, agrupados por categorias (GUILLÉN et al., 2009).

A composição de compostos fenólicos do azeite pode sofrer variações, qualitativas e quantitativas, devido a fatores que vão desde condições climáticas de cultivo até o armazenamento do produto final. Bakhouch et al. (2013) caracterizaram o conteúdo fenólico de azeites de oliva extra virgem derivados da variedade Arbequina de diferentes regiões do sul da Catalunha (Espanha). Estes autores observaram que todos os azeites analisados mostraram baixas concentrações de flavonóides e alta concentração de compostos derivados de secoiridoides.

Outro estudo conduzido por Ocakoglu et al. (2009) avaliou o perfil fenólico de azeites extra virgem produzidos na Turquia, obtidos a partir de seis variedades de oliva (Erkence, Memecik, Domat, Nizip-Yaglik, Gemlik e Ayvalik). Pela análise dos resultados as amostras apresentaram diferenças significativas quanto ao perfil de fenólicos totais, com o azeite da variedade Erkence apresentando o maior conteúdo de fenólicos totais (356.65 ± 59.2 mg GA/kg) e da variedade Nizip apresentando o menor teor (102.4 ± 32.68 mg GA/kg). A determinação de fenólicos individuais, por análise HPLC (High performance liquid chromatography) mostrou que os principais compostos fenólicos presentes nos azeites turcos analisados foram: hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, luteolina e apigenina.

3.2 Categorias de azeite de oliva: processamento e parâmetros de qualidade

Métodos tradicionais de extração de azeite de oliva incluem, principalmente, a prensagem à frio (pressão tradicional) e processamento por decantação. Considerando-se a produção em escala industrial, os métodos tradicionais de processamento da oliva deram lugar a processos modernos de extração, utilizando variação de pressão e temperatura (AOQUI, 2012; AL-OTOOM et al., 2014).

O método por pressão tradicional começa por esmagamento da azeitona. O objetivo é romper as células do fruto e permitir que o óleo esorra. Em seguida a pasta de azeitona deve ser misturada, neste estágio as gotículas de óleo se fundem em gotas maiores até formarem “bolsas” (coalescência) que podem ser separadas dentro de uma fase líquida contínua, e então, pode ser separada das outras fases por pressão, centrifugação ou percolação. Nem todo azeite presente na oliva é liberado: um remanescente permanece no

interior das células desprotegido, certo volume permanece no sistema coloidal da pasta de oliva (microgéis) e um pouco é ligado a uma emulsão vegetal com água (ESPÍNOLA et al., 2009). Al-Otoom et al. (2014), acrescentam que este método não permite uma prensagem contínua, e os filtros podem ser contaminados facilmente, comprometendo a qualidade do produto final.

Quanto ao método por decantação, a pasta de azeitona permanece em contato com a água, até que essa mistura se torne bifásica devido à densidade do óleo e sua migração para a superfície, em seguida, a fase de azeite passa por processo de decantação. Este método pode comprometer a qualidade final do produto, devido a alterações enzimáticas na massa de azeitona em contato com a água por longo tempo. Decantadores modernos podem usar sistema de centrifugação, para acelerar o processo, reduzindo, assim, a ação das enzimas (AL-OTOOM et al., 2014).

Na indústria os métodos de separação devem ser aqueles capazes de otimizar o processamento, tornando-o mais barato, fácil, simples ou mais eficiente em relação aos processos de separação tradicionais; e ainda de reduzir ou evitar os pontos críticos de processamento e obter um produto final de qualidade com maior rendimento possível. Dentre os métodos modernos destacam-se como tecnologias emergentes na indústria de azeite: o Sistema de Extração Supercrítica, o Sistema de Ultrassom e o Sistema de Microondas (CLODOVEO et al., 2013; AL-OTOOM et al., 2014).

No Brasil os parâmetros químicos e sensoriais de qualidade do azeite são avaliados segundo a RDC 270/2005 (ANVISA, 2005) e Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2013). A União Europeia segue a Regulação Comissionária, cujo protocolo é o *International Olive Oil Council* (IOOC) n°. 2568/91 (BOSQUE-SENDRA et al.; 2011).

De acordo com o CODEX Alimentarius (CODEX STAN 33-1981; alterado em 2013) o azeite de oliva é classificado de acordo com o processo de obtenção, os procedimentos tecnológicos aplicados; e seguem parâmetros de qualidade estabelecidos conforme o disposto a seguir:

- Azeite de oliva: é o óleo obtido unicamente do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), com exclusão dos óleos obtidos com uso de solventes ou processo de reesterificação, e de qualquer mistura com óleos de outra natureza.

- Azeite de oliva virgem: são os óleos obtidos do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos em condições térmicas que não acarretem alterações no óleo, e que não tenha sido submetido a qualquer outro tratamento, além de lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Azeite de oliva virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2,0g por 100g e, cujas outras características correspondem às definidas para esta categoria.
- Azeite de oliva virgem extra: azeite de oliva virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8g por 100g e, cujas outras características correspondem às definidas para esta categoria.

É reconhecido, atualmente, que o azeite de oliva extra virgem é um produto para o consumo humano que contém naturalmente apreciáveis quantidades de compostos fenólicos, os quais são os principais responsáveis pela estabilidade do azeite com relação aos processos de auto-oxidação e termo-oxidação, que levam deterioração do produto. A auto-oxidação começa quando o azeite ainda está no fruto, enquanto que a termo-oxidação se inicia após o óleo ser obtido a partir do fruto e prossegue, principalmente, durante a estocagem. Ambos os processos afetam a composição e as características sensoriais do azeite (MORALES, LUNA e APARICIO, 2005; MULINACCI et al., 2013).

Após a colheita os polifenóis passam por certas reações que podem diminuir a capacidade antioxidante da amostra. Diferentes aspectos pós-colheita, como condições de estocagem (tempo, temperatura, atmosfera) e processamento (corte, tempo e temperatura de possíveis tratamentos, adição de antioxidantes sintéticos) podem afetar a capacidade antioxidante dos alimentos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

Em condições de armazenamento no escuro e a baixa temperatura (0-8°C) os parâmetros físico-químicos do azeite de oliva são estáveis por, pelo menos, 24 meses (BOSQUE-SENDRA et al., 2011). Dado o seu valor para a saúde e seu custo de produção, o azeite de oliva é mais caro que outros tipos de óleos vegetais, e por isso, um alvo para adulteração (POULIAREKOU et al., 2011).

3.3 Produção e tendência de mercado do azeite de oliva

O *International Olive Council* (IOC, 2014), órgão internacional de olivicultura, afirma que a União Europeia (UE) é o maior produtor mundial de azeite de oliva, responsável por cerca de 4/5 do fornecimento total.

A Figura 2 mostra a produção mundial de azeite de oliva em milhares de toneladas, pelos principais países produtores e, por outros países do mundo, no período de 1990-2012. Nota-se que a produção de azeite de oliva cresceu consideravelmente, tanto em países tradicionais na produção de azeite, quanto em outras localidades não tradicionais na olivicultura. Vale ressaltar que a UE apresentou uma taxa de crescimento ligeiramente menor em relação aos demais países do mundo, efeito do aumento da produção de países até então não tradicionais na cultura de oliva e derivados. Contudo a cultura do azeite nos chamados países “não tradicionais” ainda apresenta-se em ascensão e, a produção representa uma pequena parte da oferta mundial do produto. Destaca-se que no mesmo período a Espanha tornou-se a líder de produção e comércio de azeite, substituindo a Itália (POMARICI e VECCHIO, 2013).

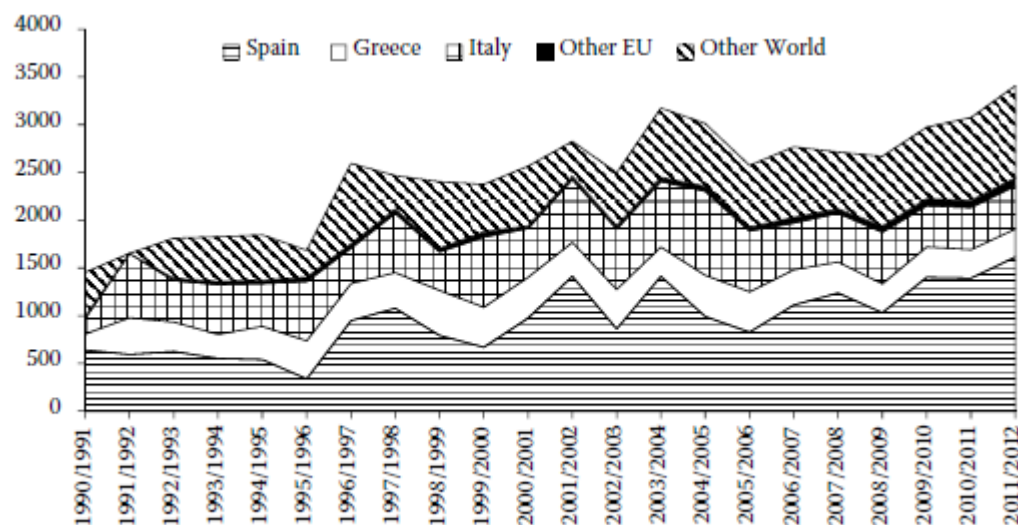


Figura 2. Produção Mundial de Azeite de Oliva (milhares de toneladas) Fonte: *International Olive Council*, 2013. (POMARICI e VECCHIO, 2013).

Em relação ao consumo do azeite de oliva, Pomarici e Vecchio (2013), relatam mudanças importantes, uma vez que o crescimento no consumo do produto foi bastante elevado durante os anos 90 quando a demanda mundial aumentou em torno de 50%. Esta tendência continuou até 2004/2005, quando o consumo mundial atingiu um pico máximo de 2,9 milhões de toneladas, com ligeira diminuição nos anos seguintes, 2,8 milhões de toneladas em 2007/2008.

Dados da EMBRAPA Clima Temperado (2011) indicam que as regiões brasileiras com maior índice de consumo de produtos importados derivados da oliveira são: São Paulo (54%), Rio de Janeiro (17%), Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (15%), Minas Gerais e Bahia (8%) e Norte e Nordeste (6%). Em relação à importação de azeite nos anos de 2003, 2004 e 2005, o estado de São Paulo foi o maior importador nacional, consumindo 39,92%, 52,1% e 47,21%, respectivamente.

No período de 2006-2013, um percentual de 74% do total de importações foi de origem europeia, sendo Portugal, Itália, Grécia e Espanha os principais produtores. As notícias estão em concordância com a literatura afirmando que a Espanha se mantém como o maior produtor de azeite do mundo, no entanto, os maiores fornecedores de azeite de oliva para o Brasil são os portugueses, responsáveis por 56% do total das importações deste produto (EMBRAPA Clima Temperado, 2011).

No ano de 2014 o *International Oil Council* (IOC) disponibilizou dados estatísticos de produção, importação, exportação e consumo de azeite de oliva pela União Europeia e por diversos outros países do mundo. Para o Brasil foram tabelados dados de consumo e importação, cujos valores médios foram: 28,6 toneladas no período de 1990/2001 a 2007/2008, e 61,3 toneladas no período de 2008/2009 a 2014/2015, respectivamente, com um aumento de 8,3% neste último período (IOC, 2014).

A Figura 3 mostra os principais países exportadores de azeite de oliva que comercializam com o Brasil. Pode-se afirmar que, praticamente, 100% das exportações de azeite de oliva para o Brasil são realizadas por Portugal, Espanha, Argentina e Itália (EMBRAPA Clima Temperado, 2011). Observa-se o destaque que Portugal apresenta como país exportador de azeite, por isso da escolha da amostra denominada “referência” neste estudo.

Países	Participação (%)		
	Anos		
	2003	2004	2005
Portugal	50,6	51,98	52,56
Espanha	26,33	27,04	27,55
Argentina	18,42	14,49	13,39
Itália	3,72	4,94	5,86
Grécia	0,08	0,13	0,2
Tunísia	0	0,24	0,17
França	0,28	0,15	0,12
Chile	0,19	0	0,09
Peru	0	0,07	0,03
Estados Unidos	0,01	0,01	0,01

Figura 3: Ranking (em percentagem) dos países que exportaram azeite de oliva ao Brasil nos anos de 2003, 2004 e 2005. (Fonte: Embrapa Clima Temperado, 2011).

Segundo a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2011), os países que mais importam azeite de oliva são os Estados Unidos, seguido da Comunidade Europeia, Austrália e Brasil.

O Brasil é considerado um dos maiores importadores mundiais de azeitonas e derivados, sendo que no mercado varejista brasileiro é possível encontrar diversas marcas comerciais de azeite com diferentes padrões e preços. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, em 2009, foram importados aproximadamente 44 mil toneladas de azeite e 70 mil toneladas de azeitona em conserva, o que movimentou mais de um bilhão de reais no mercado nacional com esses produtos (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Conforme relatado por Ballus (2010) o mercado de azeites de oliva no Brasil já apresentou vendas de aproximadamente 32.000 toneladas, posicionando-o entre os 10 países de maior consumo no mundo. Entretanto, ainda há um grande potencial de crescimento para o azeite de oliva no país, pois o consumo *per capita* ainda é muito baixo.

Informações da EMBRAPA (2011) indicam que existam cerca de 10 milhões de hectares de oliveiras plantadas no mundo, sendo que 90% da área de cultivo está localizada na costa do Mar Mediterrâneo, cujos principais países produtores pertencem à Comunidade Europeia, responsável por 80% da produção mundial. Espanha, Itália e Grécia dominam o mercado mundial de azeite, em particular a Espanha, o país mais importante e dinâmico em relação à produção de oliva.

Araghipour et al. (2008) afirmam que a origem geográfica dos alimentos desempenha um papel importante em sua qualidade. A Tabela 1 relaciona as diferentes variedades de azeitona e sua respectiva origem.

Tabela 1. Diferentes variedades de azeitona e sua respectiva origem (BAYRAM, et al., 2012).

País	Variedade
Itália	Coratina Tonda Iblea Nocellara, Biancolilla, Ogghiaredda; Cerasuola, Dritta, Fantoio, Leccino, Ogliarola
Espanha	Picual, Arbequina, Hojiblanca, Cornicabra, Frantoio, Leccino, Picudo
Portugal	Cobrançosa, Verdeal Transmontana, Madural, Arbequina, Galega,
Grécia	Kroneiki, Anthinoleia
França	Cayon, Brun, Boutellion, Aglandau
Turquia	Edremit, Ayvalik, Memecik, Hasebi, Halhali, Saurani, Kroneiki
Austrália	Fantoio, Leccino
EUA	Manzanillo, Mission, Leccino, Fantoio
África do Sul	Leccino, Fantoio, Coratina

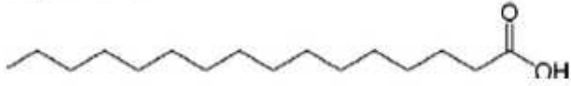
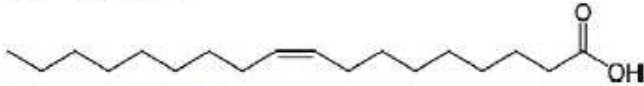
Estudos recentes tem confirmado que a produção de azeite está se espalhando para países onde, tradicionalmente, o consumo era baixo, mas que devido o aumento da demanda gerada pela sua associação com a chamada “Dieta do Mediterrâneo”, se tornaram mercados em potencial. A Argentina é o único país da América do Sul que aparece entre os dez maiores produtores (ARAGHIPOUR et al., 2008; SCHEIDEL e KRAUSMANN, 2011; BOSQUE-SENDRA et al., 2011; EMBRAPA, 2011).

3.4. Atividade biológica de compostos químicos do azeite de oliva extra virgem

3.4.1 Composição em ácidos graxos

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos e, geralmente, possuem uma longa cadeia alifática não ramificada. São classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, conforme suas propriedades químicas e estruturais. Dentre os AG saturados dietéticos destacam-se os ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0). Ácidos graxos monoinsaturados, *MUFAs* do inglês “*monounsaturated fat acids*” como é comumente denominado, contém um par de átomos de carbono ligados por uma dupla ligação na conformação *cis*. O ácido oleico possui 18 átomos de carbono com uma dupla ligação no carbono na posição nove, a partir extremidade metil da molécula de AG (18:1n-9), e caracteriza-se por ser o mais abundante *MUFA* dietético e representa 55 a 83% do total de AG presente no azeite de oliva (LOPEZ et al., 2014).

A família de ácidos graxos poliinsaturados (*PUFAs* - *polyunsaturated fat acids*) compreende cadeias carbônicas com duas ou mais duplas ligações *cis*, em que a primeira ligação dupla localiza-se entre o terceiro e o quarto átomo de carbono, ou entre o sexto e sétimo átomo de carbono a partir da terminação metil da molécula de ácido graxo. Estas famílias incluem ácidos graxos que não podem ser sintetizadas pelo corpo humano, portanto devem ser obtidos a partir da dieta como o ácido α -linolênico (18:3n-3) e ácido linoleico (18:2n-6) ou seus derivados *PUFAs* de cadeia longa. Destes o ácido eicosapentanoico (20:5n-3), ácido docosahexaenóico (22:6n-3) e ácido araquidônico (20:4n-6) são importantes para múltiplos processos fisiológicos como a manutenção da integridade estrutural de membrana celular e produção de energia, são precursores de eicosanóides e fatores ligantes para transcrição, e mensageiros de vias celulares. A biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa em vertebrados envolve uma série de reações de desaturação e alongação de ácidos graxos poliinsaturados C18 precursores, ácido α -linolênico (ALA, 18:3n-3) e ácido linoleico (LA; 18:2n-6) (LOPEZ et al. 2014; KUAH et al., 2015; LIU et al., 2015). A Figura 4 apresenta a estrutura química e percentual relativo dos principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva.

Fatty acid	Regulations ^a (%)
16:0, palmitic acid 	7.5–20.0
18:0, stearic acid 	0.5–5.0
18:1n – 9, oleic acid 	55.0–83.0
18:2n – 6, linoleic acid 	3.5–21.0
18:3n – 3, α-linolenic acid 	≤1.0
MUFAs, monounsaturated fatty acids	53–87
SFAs, saturated fatty acids	8–26
PUFAs, polyunsaturated fatty acids	3–22

^a International Olive Oil Council (www.internationaloliveoil.org).

Figura 4: Estrutura química dos principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva (Fonte: LOPEZ et al., 2014).

Lopez et al. (2014) relatam que as concentrações de AG saturados (ácido palmítico e esteárico) e *PUFAs* (ácidos α -linolênico e linoleico) no azeite de oliva variam de 8 a 25% e 3 a 21% dos ácidos graxos totais, respectivamente. Alguns parâmetros como área de produção, altitude, clima, variedade da oliva, e grau de maturação do fruto podem afetar diretamente a composição de ácidos graxos do azeite de oliva.

A “Dieta Mediterrânea” caracterizada por um alto consumo de azeite de oliva, rico em ácido oleico, tem sido tradicionalmente ligada ao efeito protetor contra diversos tipos de cânceres. O ácido oleico, ácido graxo ômega-9, é considerado um lipídeo saudável da dieta uma vez que ocorre naturalmente em várias gorduras animais, e principalmente, em óleos vegetais (MOON, BATIREL E MANTZOROS, 2014).

Quanto aos efeitos diretos do consumo de azeite de oliva sobre a redução do risco de desenvolvimento do câncer de próstata, Ferrís-Tortajada et al. (2012) destacam a elevada

concentração de ácido oleico em detrimento da baixa concentração de gorduras saturadas, além, de outros nutrientes antioxidantes como a vitamina E, esqualeno, e compostos fenólicos. Há relatos de que o ácido oleico regula a oncogênese em testes *in vitro*.

Pérez-López et al. (2013), ressaltam que nenhum outro óleo natural apresenta quantidade expressiva de ácidos graxos monoinsaturados quanto o azeite de oliva extra virgem. E, o consumo regular deste azeite pode reduzir os níveis de pressão arterial através da ação sinérgica do ácido oleico, α -tocoferol, polifenóis, e outros compostos fenólicos ausentes nos demais óleos vegetais.

3.4.2 Pigmentos: clorofila e carotenóides

A cor é uma importante característica de qualidade, e desempenha papel fundamental como fator de aceitabilidade entre os consumidores. O fruto da oliveira contém pigmentos verdes de planta, chamado clorofila, responsável pela cor das olivas; os pigmentos naturais derivados de clorofila, feofitinas e pirofeofitinas, são os pigmentos mais estáveis presentes na oliva (DEL GIOVINE e FABIETTI, 2005). Motilva e Romero (2010) afirmam que esses pigmentos desempenham um importante papel na estabilidade oxidativa do azeite de oliva virgem devido ao seu poder antioxidante natural na ausência de luz, e atividade pró-oxidante na presença de luz.

Clorofilas são consideradas fitoquímicos com importantes propriedades para o organismo animal como atividade antioxidante, atividade antimutagênica, modulação de enzimas de metabolização de xenobióticos, e indução de apoptose em linhagens celulares de câncer (FERRUZZI e BLAKESLEE, 2007).

Em termos botânicos a oliva é um fruto de cor verde nos primeiros estágios de crescimento, devido à maior presença de clorofila em relação aos carotenóides, e gradualmente, passa a apresentar coloração roxa escura à preta devido à progressiva síntese de antocianinas até os estágios finais de maturação (ROCA e MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2003).

Os carotenóides compreendem uma classe de mais de 600 pigmentos naturais sintetizados por plantas, algas e bactérias fotossintéticas, podendo desempenhar ainda um

importante papel como compostos funcionais (APARICIO-RUIZ, MÍNGUEZ-OSQUERA E GANDUL-ROJAS, 2011).

Além da pró-vitamina A, numerosos estudos epidemiológicos relatam que uma dieta rica em carotenóides está associada a uma redução no risco de certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, degeneração macular (relacionado à idade e catarata); uma vez que apresentam atividade antioxidante capaz de bloquear o oxigênio *singlete*, uma forma ativa do oxigênio, impedindo a oxidação de tecidos orgânicos (APARICIO-RUIZ, MÍNGUEZ- OSQUERA e GANDUL-ROJAS, 2011; SAMANIEGO-SÁNCHEZ et al., 2010).

A composição de carotenóides do azeite de oliva está sujeita a uma ampla variação devido a diferenças entre as cultivares e grau de maturação da oliva, latitude, condições ambientais, técnicas de processamento e condições de estocagem. Oliva em estado avançado de maturação possui um conteúdo médio de carotenóides em torno de 2 a 20 mg/kg (APARICIO-RUIZ, MÍNGUEZ- OSQUERA E GANDUL-ROJAS, 2011).

3.4.3 Tocoferóis e tocotrienóis

Conhecidos pelo nome genérico de ‘vitamina E’, os tocóis são caracterizados por um grupo de compostos lipídicos incluindo quatro espécies químicas de tocoferóis (α , β , δ e γ) e quatro de tocotrienóis (α , β , δ e γ), que se diferenciam em sua estrutura molecular. O α -tocoferol é a forma mais comum de vitamina E, que apresenta uma maior atividade biológica dentre esses compostos. Os estudos relatam atividade preventiva do tocoferol contra espécies reativas de oxigênio (ROS) em sistemas biológicos, ou seja, este desempenha efeito protetor contra o envelhecimento celular e alguns tipos de câncer, atuando na manutenção do sistema imune e na redução do risco de doenças cardiovasculares; além de proteger ácidos graxos de cadeia longa (PUFA) contra oxidação (BELTRÁN et al., 2010; LAURIDSEN, THEIL e JENSEN, 2013).

A principal modalidade de atividade antioxidante da vitamina E é baseada na capacidade de bloquear a propagação de reações de radicais gerados pelas ROS (GALEANO-DÍAZ, ACEDO-VALENZUELA e SILVA-RODRÍGUEZ, 2012).

Os antioxidantes fundamentais do azeite de oliva virgem são tocoferóis e compostos fenólicos; os primeiros são moléculas lipofílicas, enquanto que fenólicos constituem a composição hidrofílica do azeite. O conteúdo de vitamina E no azeite de oliva é baixo se comparado a outros óleos vegetais, assim, os polifenóis são os maiores responsáveis por proteger o azeite da oxidação (OWEN et al., 2000; GALEANO-DÍAZ, ACEDO-VALENZUELA e SILVA-RODRÍGUEZ, 2012; MANAI-DJEBALI et al., 2012).

No azeite de oliva o α -tocoferol representa mais que 95% do conteúdo de tocoferol total que varia entre 50 e 300 mg/kg. O conteúdo e composição de tocoferol no azeite depende de vários fatores agronômicos como cultivar (variedade), maturação do fruto e condições agroclimáticas (BELTRÁN et al., 2010).

3.4.4 Compostos fenólicos

Os fenólicos de azeite de oliva podem variar desde fenóis simples até estruturas muito complexas com um ou mais grupos hidroxila, e podem ainda estar ligados a moléculas de açúcar, contudo, a estrutura de vários compostos fenólicos do azeite de oliva ainda não foi esclarecida (OROZCO-SOLANO et al., 2012; VICHIA, CORTÉS-FRANCISCO e CAIXACH, 2013).

Fenólicos de azeite de oliva, que se caracterizam por ter caráter polar e meio polar, têm sido os componentes do azeite de oliva mais estudados nos últimos anos. Os compostos fenólicos são considerados os principais responsáveis pelo efeito preventivo do azeite de oliva contra dano oxidativo. Sua presença em quantidades adequadas é fundamental para o funcionamento celular ótimo e saúde sistêmica (KALOGEROPOULOS et al., 2007; OROZCO-SOLANO et al., 2012).

Enquanto que os secoiridoides oleuropeína e ligstrosídeo são os principais compostos minoritários dos frutos da oliveira, as agliconas e deacetoxi agliconas - derivados de secoiridoides, o hidroxitirosol e o tirosol, são predominantes no extrato hidrofílico do azeite da oliva. É durante o processo de maturação, processamento e extração do azeite que vários compostos podem ser formados por isomerização após hidrólise de oleuropeína e ligstrosídeo (RODRIGUEZ-RAMIRO et al., 2011; VICHIA et al., 2013).

Tirosol, hidroxitirosol e derivados secoiridoides representam cerca de 30% do conteúdo fenólico total do azeite de oliva, que geralmente varia entre 130 e 350 mg/kg (OROZCO-SOLANO et al., 2012). Decarboximetil oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EDA), hidroxitirosol e tirosol juntos apresentam efeito sinérgico quanto a sua atividade antioxidante (MATEU-DE ANTONIO e MARÍN-CASINO, 2013).

O hidroxitirosol é considerado o mais abundante e representativo fenólico do azeite de oliva, seu efeito protetor contra estresse oxidativo citotóxico induzido tem sido sistematicamente demonstrado (RODRIGUEZ-RAMIRO et al., 2011).

A Figura 5 mostra a estrutura molecular dos principais compostos fenólicos, com atividade biológica, identificados no azeite de oliva extra virgem (OMAR, 2010).

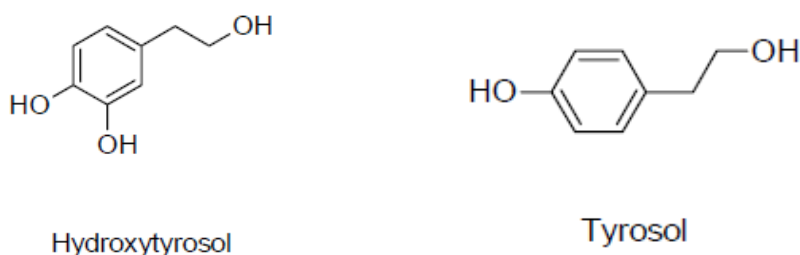


Figura 5. Estrutura química dos principais compostos fenólicos com atividade biológica identificados no azeite oliva extra virgem (Fonte: OMAR, 2010).

3.4.4.1 Compostos fenólicos: metabolismo

É evidente que as formas bioativas, *in vivo*, de determinados compostos não são necessariamente a forma fitoquímica natural. Após a ingestão do azeite de oliva os fenólicos tirosol e hidroxitirosol, bem como, glicosídeos e agliconas de secoiridoides, podem sofrer reações de conjugação e/ou hidrólise rápida, resultando em aumento na quantidade de tirosol e hidroxitirosol nas formas livres. Os produtos da digestão apresentam bioatividade, e são, enfim, absorvidos pelo intestino delgado (COVAS et al., 2010; SPENCER, MOHSEN, e RICE-EVANS, 2004).

Pesquisas têm mostrado que os compostos fenólicos hidroxitirosol e tirosol são absorvidos após ingestão de maneira dose-dependente, e que houve aumento na sua biodisponibilidade quando administrados como uma solução de azeite de oliva comparado a uma solução aquosa. (CICERALE, LUCAS e KEAST, 2010; KHYMENETS et al., 2011). Por outro lado, Covas et al. (2010) ao realizarem perfusão isolada de oleuropeína no intestino de ratos, observaram que esse composto apresenta baixa biodisponibilidade. Sugerindo que para a oleuropeína exercer de maneira mais eficiente sua atividade biológica seria necessária sua conversão para hidroxitirosol.

No fígado os compostos fenólicos, particularmente aqueles ligados a um grupo catecol, são biotransformados por três sistemas enzimáticos: catecol-O-metil-transferase, sulfatases, e glucuronosil-transferases, e então, excretados (COVAS et al., 2010; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

3.4.4.2 Compostos fenólicos: atividade biológica *in vitro*

Fernandez-Arroyo et al. (2012) avaliaram a capacidade antiproliferativa e o metabolismo das principais famílias de polifenóis de azeite em cultura celular de adenocarcinoma de cólon humano (SW480 e HT29) com uma suplementação exógena de extratos de azeite, em diferentes concentrações. Os autores observaram, pela análise do meio de cultura e citoplasma celular que a oleuropeína (ou seus derivados metabólicos) e a quercetina foram os dois compostos fenólicos principais presentes no citoplasma. Ambos os compostos demonstraram possuir atividade antiproliferativa, atuando através de diversos mecanismos incluindo inibição proteica, apoptose ou inibição de atividades enzimáticas.

Fabiani et al. (2011) mostraram que isolados de 3,4-DHPEA (hidroxitirosol), e outros compostos fenólicos similares presentes no azeite, são capazes de induzir à apoptose em células de leucemia (HL60). Os resultados apontaram que a maior parte do efeito pró-apoptótico de 3,4-DHPEA e seus derivados 3,4-DHPEA-EDA (hidroxitirosol dialdeído) e oleuropeína é devido à produção extracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mecanismo que não é apresentado pelos demais compostos como *p*-HPEA (tirosol) e *p*-HPEA-EDA (tirosol dialdeído) sugerindo que o grupo catecol presente na molécula é necessário para a produção de H_2O_2 .

O mesmo mecanismo de ação protetora foi demonstrado em outro estudo, utilizando extrato fenólico de azeite de oliva virgem comercial sobre o DNA nuclear (nDNA) em células de carcinoma cervical (EROL, ARDA e ERDEM, 2012) .

Rosignoli et al. (2013) além de estudarem o potencial antioxidante de fenólicos de azeite de oliva, investigaram os efeitos dos fenólicos isolados, em diferentes concentrações, sobre a expressão da cicloxigenase (COX₂), uma enzima pró-inflamatória em células primárias de monócitos humanos. Evidenciando que há modulação de marcadores anti-inflamatórios a concentrações relativamente maiores que atingidos *in vivo*. No entanto, os autores afirmam que o consumo regular de azeite de oliva extra virgem de curta vida de prateleira pode resultar em um efeito anti-inflamatório geral. Esta conclusão é apoiada por diversos estudos clínicos mostrando que o consumo de azeite de oliva pode influenciar diferentes marcadores inflamatórios em humanos como tromboxanos, interleucinas, leucotrienos e cicloxigenases (TXB₂, IL7, LTB₄, COX₁ e COX₂; respectivamente).

Sarria et al. (2012) relatam que células de hepatoma humano (HepG2) são largamente utilizadas para estudos bioquímicos e nutricionais. Essa linhagem celular representa um bom modelo de cultura de células de hepatócitos humanos uma vez que preserva a morfologia e a maioria das funções dos hepatócitos. Os mesmos autores afirmam que o hidroxitirosol previne dano por estresse oxidativo em células hepáticas através da modulação de vias de sinalização envolvidas na regulação enzimática antioxidante/desintoxicante.

Considerando a relação entre a Dieta Mediterrânea e diminuição da prevalência de doenças cardiovasculares tem sido mostrado que o azeite de oliva extra virgem rico em polifenóis aumenta a resistência da LDL (lipoproteína de baixa densidade) à oxidação, *in vitro* e *in vivo*.

Neste contexto, em um estudo clínico de Bogani et al. (2007) mostrou que pode haver atividade cardioprotetora em estado pós-prandial de voluntários saudáveis após a ingestão de azeite de oliva extra virgem enriquecido com fenólicos do próprio azeite. Ao avaliarem o perfil pós-prandial de lipídeos séricos e marcadores cardiovasculares, os autores concluíram que essa proteção pode ser atribuída à fração fenólica, e não apenas ao conteúdo de MUFA (*monounsaturated fat acids* - ácidos graxos monoinsaturados).

Sánchez-Fidalgo et al. (2013) ao realizarem a suplementação dietética de azeite de oliva extra virgem, enriquecido com o extrato fenólico, em modelos animais com colite ulcerativa induzida, observaram que houve redução na severidade e na extensão progressiva do dano colônico .

Observa-se que o maior número de trabalhos utiliza extrato fenólico ou isolado de compostos fenólicos, porém como afirmam Castelo-Branco e Torres (2011), a atividade antioxidante dos componentes do óleo pode ser afetada pelo sinergismo entre os compostos antioxidantes e complexa afinidade dos compostos com as interfaces ar-óleo e/ou óleo-água no meio. A localização dos antioxidantes em interfaces causa um fenômeno conhecido como paradoxo polar, no qual os antioxidantes polares são mais efetivos em meios apolares e vice-versa. O que sugere mecanismos de ação distintos para os compostos antioxidantes nas diferentes frações isoladas. Portanto, seria importante investigar a capacidade antioxidante dos óleos na sua forma integral, e não apenas do extrato fenólico.

3.5 Equilíbrio redox e sistema de defesa celular endógeno contra espécies reativas

O surgimento do oxigênio no planeta permitiu que os organismos utilizassem os nutrientes de maneira mais eficiente, porém, também causou a exposição das células a uma variedade de oxidantes chamadas espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species - ROS*), resultantes de uma redução incompleta do oxigênio. Portanto, *ROS* são formadas em condições fisiológicas e patológicas nos mamíferos, e estão envolvidas na fisiopatologia de um grande número de doenças devido à sua alta reatividade com biomoléculas incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. A fim de diminuir a concentração dessas *ROS*, os organismos aeróbios mais evoluídos possuem uma variedade de enzimas antioxidantes e outras moléculas antioxidantes de baixa massa molecular. Os estudos afirmam que os processos metabólicos que geram oxidantes e antioxidantes são regidos tanto por disposição genética, quanto por fatores ambientais (BARP et al., 2002; TURRENS, 2014).

O arsenal de defesa celular para controlar a magnitude na formação de *ROS* é extenso e, inclui antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase - SOD, catalase -CAT, glutathionas peroxidases, peroxiredoxinas, glutaredoxinas, thioredoxinas, sulfiredoxinas) e antioxidantes não enzimáticos (vitaminas A, C, e E, urato, bilirrubina). A ação coordenada

das enzimas antioxidantes garante a remoção eficiente de *ROS*, vale ressaltar que inúmeras evidências apontam para a necessidade de ingestão adequada de antioxidantes através da dieta, a fim de auxiliar na manutenção dos baixos níveis intracelulares de *ROS* (GAO et al., 2008; PATEL e STAPPENBECK, 2013).

Linus Pauling e Junior Sheehan (1949) foram os primeiros a definirem essas espécies reativas como uma consequência da configuração eletrônica do oxigênio molecular em seu estado fundamental, o qual apresenta dois elétrons desemparelhados em sua camada externa. Turrens (2010) explica que como resultado desta configuração eletrônica “bi-radical”, a redução de oxigênio à água ocorre através de quatro etapas consecutivas, produzindo uma variedade de intermediários parcialmente reduzidos de diferente reatividade. Quando o oxigênio molecular recebe o primeiro elétron, este é convertido em ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). O segundo elétron produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A adição de um terceiro elétron quebra a ligação entre ambos os átomos de oxigênio, gerando uma molécula de água e um poderoso oxidante chamado radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). O quarto elétron reduz o radical hidroxil produzindo OH^- (radical peroxil), este por sua vez é protonado para gerar uma segunda molécula de água.

Além disso, um dos dois elétrons desemparelhados na camada externa pode ser excitado a um novo nível de rotação, resultando na formação do oxigênio singlete, uma forma muito reativa do oxigênio capaz de reagir com a maioria das biomoléculas, particularmente com ligações duplas produzindo dioxetanos (peróxidos cíclicos). Klotz et al. (2003) acrescentam que algumas dessas reações entre o oxigênio singlete e moléculas como proteínas, lipídeos e DNA podem afetar a expressão de genes, desencadeando ou bloqueando várias respostas intracelulares.

As células possuem determinado número de mecanismos de autodefesa contra efeitos tóxicos de *ROS* incluindo sequestro de radicais livres e terminais de reação em cadeia como a SOD, catalase e glutatona reduzida. Quando o balanço entre a produção de *ROS* e as defesas antioxidantes sofre desequilíbrio, em que a formação de *ROS* excede a capacidade celular de remoção, instala-se uma condição denominada de “estresse oxidativo”, levando à injúria celular de forma rápida devido a instabilidades desses produtos oxidativos. Por isso, a remoção destes radicais livres por compostos antioxidantes pode ser estratégia de defesa efetiva contra várias doenças (DAVIES, 1995; WU et al., 2009; CARILLON et al., 2012;

TSAI et al., 2014). O termo “Radicais livres” inclui espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species - RNS*), geradas como subprodutos de reações bioquímicas intracelulares e, assim, considerados intermediários inerentes de muitos processos fisiológicos (MARÍ et al., 2010).

Segundo Mahlicli et al. (2014), a SOD e a CAT são enzimas conhecidas como o par de antioxidantes mais importantes no sangue e, constituem o sistema mais eficaz de regulação dos níveis de radicais livres.

3.5.1 Catalase

Catalases pertencem a uma classe de enzimas que catalisam a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Estão presentes nos mais diversos organismos vivos: araquinídeos, bactérias, fungos, plantas e animais, incluindo o homem. A evolução de enzimas de atividade catalítica foi um processo fundamental na evolução da vida aeróbica e independentemente conduzido ao aparecimento de três famílias de genes de metaloenzimas, chamadas comumente catalases heme (monofuncional), catalase-peroxidase heme bifuncional e catalase manganês (não-heme) (NICHOLLS, 2012; OBINGER, 2012).

A catalase tem função regulatória nos níveis de espécies reativas de oxigênio e pode reduzir o risco de metástase de tumores, assim, a catalase pode desempenhar um importante papel em impedir a proliferação do câncer (NISHIKAWA, 2008; TSAI, 2014).

Valdameri et al. (2011) investigaram se os níveis de RNAm e a atividade de diferentes enzimas antioxidantes e *ROS* são afetadas pelo flavonóide apigenina, e se essas alterações poderiam ser associadas ao mecanismo de apoptose induzida pela apigenina em células de hepatoma humano HepG2. Apigenina é um flavonoide de ocorrência natural em plantas, abundante em vegetais e frutas. É um composto de caráter bioativo com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais contra várias linhagens celulares humanas de câncer. Os autores observaram que o tratamento com apigenina levou à formação de *ROS* e significativa diminuição na expressão gênica e atividade da catalase, por outro lado, o tratamento não alterou a expressão ou atividade de outras enzimas antioxidantes. Além disso, ao adicionarem catalase exógena houve redução significativa

nos efeitos da apigenina sobre a morte celular de HepG2, sugerindo que o aumento dos níveis de H_2O_2 poderia estar envolvido na morte celular induzida por apigenina.

Tsai et al. (2014) afirmam que diversas evidências clínicas indicam que a auto-regulação de várias catepsinas, proteases envolvidas no metabolismo celular em muitos tipos de câncer humano, é correlacionada com a progressão maligna e mal prognóstico do paciente. Além disso, o aumento da atividade da catalase ou acúmulo de peróxido de hidrogênio correlaciona-se com metástase de câncer. Estudos recentes indicam que a expressão e ativação da catepsina podem ser moduladas com o tratamento de H_2O_2 . Entretanto a atual relação entre a catalase e a catepsina ainda não está bem compreendida.

Os autores demonstraram que a catalase previne o acúmulo de ROS (H_2O_2) e modula a migração e invasão induzida por catepsina em células tumorais de intestino, indicando a importância de regulação da catalase durante metástase ou formação do câncer, portanto, pode ser um alvo na terapia anti-câncer.

3.5.2 Superóxido Dismutase - SOD

Nedeva et al. (2004), explica que organismos eucariotos possuem duas formas de SOD codificados pelo gene da SOD1 e SOD2. A SOD1 codifica a SOD ligada a cobre-zinco (Cu, Zn-SOD), localizada principalmente no citosol, mas, pode ser encontrada ainda na mitocôndria, núcleo e lisossomos. O marco da descoberta da SOD, em 1995, despertou um considerável interesse na química e biologia dos radicais livres, hoje reconhecidos em múltiplas funções celulares, doenças, e envelhecimento (MARÍ et al., 2010).

A SOD catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que, por sua vez é convertido em água em oxigênio pela glutathione peroxidase e catalase. Considerando a reatividade e sítio de localização onde as espécies reativas são formadas no interior da célula, as defesas antioxidantes enzimáticas são compartimentalizadas para neutralizar estas espécies de forma mais eficiente. Por exemplo, a SOD está localizada no citosol (Cu=Zn SOD) ou na mitocôndria (Mn-SOD), assim, é capaz de reagir com *pools* diferentes de ânion superóxido gerados extra ou intra mitocôndria (GAO et al., 2008).

Estudos afirmam que o desequilíbrio do estresse oxidativo no fígado pode interferir no metabolismo da glicose e, contribuir para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus (KIM

et al., 2013). Gu et al. (2015) avaliaram os níveis e atividade da SOD em tecido hepático de ratos pós-tratamento com *Portulaca oleracea L.*, planta comumente usada na medicina chinesa contra diversas doenças devido aos seus componentes bioativos. Os autores relatam diminuição na atividade da SOD em hepatócitos de ratos induzidos à Diabetes com base no desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante, resultados que corroboram com a literatura, no entanto, após o tratamento com o extrato da planta medicinal rica em fitoquímicos houve aumento significativo na atividade da SOD, principalmente com a amostra fresca, mostrando forte atividade antioxidante.

A SOD desempenha uma função chave no controle celular de espécies reativas de oxigênio (*ROS*), e pode ser um potencial agente terapêutico contra o estresse oxidativo relacionado a doenças, uma vez que, o dano celular mediado por *ROS* relaciona-se com muitas patologias, incluindo injúria de reperfusão isquêmica, doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas, além do processo natural de envelhecimento (PERRY et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras de azeite de oliva selecionadas para este trabalho foram: três amostras de caráter monovarietal, variedade Arbequina. Destas, uma foi disponibilizada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) da Fazenda Maria da Fé, denominada de ArbequinaMG, e a outra fornecida pela empresa Olivas do Sul Agroindústria Ltda., da cidade de Cachoeira do Sul - Rio Grande do Sul, identificada neste trabalho como ArbequinaRS. Ambas, MG e RS, foram produzidas no período de Fevereiro a Março de 2013. A terceira amostra foi uma arbequina importada, nome comercial Azeite Pouns® (Fab: 03/2013 Val: 08/2015 Lote: 004/475[6]), adquirida no comércio de Campinas, cujo país de origem é a Espanha, denominada ao longo deste trabalho de ArbequinaMed ou mediterrânea.

A EPAMIG forneceu ainda um azeite da variedade Maria da Fé, cultivar desenvolvida para cultivo no Brasil pela própria empresa na Fazenda Experimental de Maria da Fé - MG, identificada com o mesmo nome de origem.

E, por fim, a amostra popularmente conhecida no mercado pela marca Gallo®, de origem portuguesa (Fab:12/2012 Val: 06/2014 Lote: L23610K097), uma vez que esta marca caracteriza-se como líder de vendas em diversos países, inclusive no Brasil, onde representa 14% das exportações portuguesas, segundo dados da Gallo Worldwide.

4.2. Caracterização química dos compostos bioativos

4.2.1 Determinação de ácidos graxos.

4.2.1.1 Preparo dos ésteres metílicos

O procedimento de esterificação foi baseado no método de Hartmann e Lago (1973). Foram pesados 50 a 60 mg de cada amostra de azeite em tubos de ensaio, com posterior adição de 4 mL de KOH 0,5 mol/L em metanol. Os tubos foram aquecidos em banho maria a $90^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, até obtenção de uma solução transparente. Nesta

etapa ocorreu hidrólise dos triacilgliceróis, liberando os ácidos graxos. Após o resfriamento, foram adicionados 5 mL de solução de BF_3 3% em metanol, e os tubos foram aquecidos novamente em banho maria a $90^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Nesta etapa realizou-se a metilação dos ácidos graxos livres, catalisada pelo BF_3 , resultado na formação de ésteres metílicos dos ácidos graxos (*FAMES*). Após o resfriamento foram adicionados 4 mL de solução saturada de NaCl, com posterior agitação. Em seguida foram adicionados 5 mL de éter de petróleo, com posterior agitação vigorosa. Por fim, os tubos foram deixados em repouso por aproximadamente 30 segundos para a separação das fases, sendo que 1 μL da fase orgânica superior de cada replicata foi injetado no cromatógrafo à gás. Cada amostra foi esterificada em triplicata.

4.2.1.2 Condições cromatográficas GC-FID

Para separação e identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, foi utilizado um cromatógrafo à gás Agilent 6850 Series GC System com detector por ionização em chama (GC-FID). Empregou-se a coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm espessura do filme). Os parâmetros ajustados foram: injeção no modo *split* (1:50); volume injetado 1,0 μL ; velocidade linear 24 cm/seg; fluxo coluna = 1,0 mL/min; gás de arraste Hélio; temperatura do injetor (250°C); temperatura do detector (280°C); programação de temperatura (110°C por 5 min, passando para 215°C a 5°C por min, temperatura final mantida por 34 min).

A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos picos do óleo padrão (óleo de mostarda), obtidos nas mesmas condições, e os tempos de retenção dos picos observados para as amostras. A quantificação foi realizada por normalização de área, ou seja, área do pico de um determinado ácido graxo em relação à área total (somatório da área de todos os picos de ácidos graxos). As condições cromatográficas foram definidas e validadas pelo Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA-Unicamp, conforme método proposto por Hartmann e Lago (1973).

4.2.2 Determinação de pigmentos

4.2.2.1 Carotenóides totais

O conteúdo de carotenos das amostras foi determinado de acordo com o método descrito por PORIM (1995). Uma alíquota de óleo foi diluída em hexano 100%, na concentração de 1 g/mL, e diluída até absorvância de 0,2 a 0,8 nm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 446 nm, a análise foi determinada em triplicata.

O conteúdo de carotenos foi expresso em miligramas de β -caroteno por quilo de óleo (mg β -caroteno / kg amostra), conforme a equação (1).

Equação. (1): $\text{Caroteno total (ppm)} = V \times (383/100 \times m) \times (\text{Abs})$

Em que: V é o volume de hexano (mL)

m é o peso da amostras (g)

Abs é valor da absorvância (nm)

4.2.2.2 Clorofila total

O conteúdo de clorofila total das amostras foi determinado de acordo com o método da AOCS (American Oil Chemists' Society), (2009).

A determinação de clorofila baseia-se em mensurar o conteúdo de pigmentos de clorofila através da medida da absorvância do óleo bruto nos comprimentos de onda de 630, 670 e 710 nm, as leituras foram realizadas em triplicata.

O conteúdo de clorofila total é expresso em miligramas de feofitina a por quilo de óleo bruto (mg feofitina a / kg) , conforme a equação (2):

Equação(2): $\text{Clorofila total (ppm)} = 345,3 \times (A_{670} - (0,5 \times A_{630}) - (0,5 \times A_{710})) / L$

Em que: A é valor da absorvância (nm)

L é o diâmetro da cubeta (mm)

4.2.3 Determinação de Tocóis (tocoferóis e tocotrienóis)

A análise de tocóis totais foi realizada conforme metodologia da AOCS, (2004). Inicialmente as amostras foram diluídas em hexano na concentração de 0,1 g/mL.

Foi utilizado um cromatógrafo UHPLC modelo Ultimate 3000 Dionex com detector de fluorescência UV/vis – com excitação de comprimento de onda de 290 nm e emissão de um comprimento de onda de 330 nm, e coluna de fase reversa HP C18 SIL X-10, 4,6 mm DI x 25 cm; a fase móvel consistiu em hexano grau HPLC (99%) e isopropanol (1%).

A curva de calibração foi realizada usando uma solução padrões de tocoferóis (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol), nas concentrações de 1 a 5 μ g/mL. A composição qualitativa de tocóis foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de tocoferóis. A composição quantitativa foi realizada por normatização da área, sendo expressa em miligramas do respectivo tocol por quilo de amostra (mg/Kg amostra). A análise foi determinada em triplicata.

4.2.4 Conteúdo de fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu descrito por Hrciriki e Fritsche (2004). Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico e fosfotungstico pelas hidroxilas dos fenóis produzindo uma coloração azul.

Inicialmente, 0,5 g de óleo foi dissolvido em 1 mL de hexano e 1 mL de metanol/água (60:40 v:v), agitado vigorosamente por 2 minutos. Ambas as fases foram separadas por centrifugação (3500 rpm, 10 min) e uma alíquota (40 μ L) da fase metanólica foi diluída em água para um volume final de 1 mL em microtubo de 2 mL, seguida pela adição de 100 μ L de reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 min, no escuro, 200 μ L de carbonato de sódio (35%) foi adicionado. A solução, então, foi agitada em vórtex, e, adicionada água destilada para volume final de 2 mL, esta solução foi mantida no escuro por 2 horas. Após esse período, adicionou-se 200 μ L da mistura reacional, em triplicata, em compartimentos de microplaca e mensurou-se a absorbância a 725 nm. O branco foi composto por todos os constituintes da reação, substituindo-se a solução fenólica por água destilada. A curva de calibração foi realizada usando uma solução padrão de ácido gálico,

nas concentrações de 0,01 - 0,1 µg/mL e os resultados determinados em triplicata, e expressos em mg de ácido gálico equivalente por quilograma de amostra (mg AGE /kg).

4.2.5 Identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos de interesse: tirosol e hidroxitirosol

4.2.5.1 Extração líquido - líquido

A caracterização e quantificação dos compostos fenólicos de interesse foi realizada de acordo com o método descrito por Ballus et al. (2014), com adaptações. O método é baseado na extração de compostos fenólicos polares a partir de amostras de azeite por meio de extração líquido-líquido (LLE), e subsequente injeção do extrato em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) associado a um detector por arranjo de diodos.

Em resumo, uma massa de 2 g de cada amostra de azeite foi dissolvida em 1 mL de hexano e 2 mL de metanol/água (60:40 v:v). A mistura foi centrifugada (3500 rpm por 10 minutos), a fase metanólica coletada, e a fase com hexano foi reextraída adicionando-se 2 mL de solução de metanol/água 60%, esse procedimento foi repetido duas vezes. Os extratos metanólicos foram então evaporados à vácuo a 39°C, e o resíduo obtido ressuspensionado em metanol/água (50:50 v:v). Finalmente, o extrato foi filtrado em membrana de 45 µm e analisado em HPLC para identificação e quantificação dos fenólicos livres.

4.2.5.2 Condições cromatográficas HPLC-DAD

O método cromatográfico foi adaptado de Hrnčirik e Fritsche (2004), realizado em UHPLC modelo Dionex com detector DAD, coluna C18 (5 µm, 4,6 mm x 150 mm, Waters, USA) mantida à temperatura de 27 °C. As fases móveis foram: solução de ácido fórmico 0,5% (sol. A) e metanol:acetonitrila (50:50 v:v) (sol. B), com volume de amostra a ser injetado de 20 µL. O gradiente das fases móveis em porcentagem de volume foram de: 0-15 min, 95% A e 5% B; 15 min, 70 % A e 30% B; 30 min, 65% A e 35% B; 37min, 60%A e

40% B; 50 min, 30% e 70% B; 55 min, 0% A e 100% B. O fluxo das fases móveis foi de 1 mL/min.

O detector DAD foi operado na faixa de 190 a 480 nm. Os fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros do UV-Vis dos padrões. Os espectros foram adquiridos entre 190 e 330 nm e os cromatogramas processados a 280 nm.

Os compostos fenólicos foram quantificados usando curvas de calibração dos padrões analíticos de hidroxitirosol e tirosol Sigma[®], e suas concentrações foram expressas em miligramas por quilograma de amostra (mg /kg). As análises foram realizadas em triplicata de amostras, e duplicata dos padrões.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante por sequestro de radicais livres

4.3.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC

Para realização do ORAC lipofílico a amostra foi dispersa em DMSO:Tween 20 (9:1 v:v) a uma concentração inicial de 40 mg/mL (NCI/ NIH, 2009 adaptado) . E, então diluída em solução tampão fosfato (75 mmol/L pH 7,4) de forma a serem obtidas concentrações finais de amostra entre 5-20 mg/mL. A solução final de cada concentração foi agitada vigorosamente em Ultra Turrax (Ultra Turrax Tube Drive Control Workstation - IKA[®]) a 4000 rpm por 5 minutos.

O método ORAC utilizado, com fluoresceína (FL) como sonda de fluorescência, foi descrito por Ou et al. (2002) e, adaptado por Macedo et al. (2011). As amostras foram preparadas em três concentrações diferentes diluídas em tampão fosfato 75 mmol/L pH 7,4. Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, *AcrosOrganics, Belgica*) foi preparado como padrão de referência em concentrações entre 1,5 e 1500 µmol/L em tampão fosfato 75 mmol/L pH 7,4. Alíquotas de 20 µL da amostra, solução de Trolox[®] ou tampão (branco) foram distribuídos em placa com 96 poços (cor preta e opaca) seguidas da adição de 120 µL de solução de sal sódico de fluoresceína 0,38 µg/mL (Ecibra, São Paulo, Brasil) diluída em tampão fosfato 75 mmol/L pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de 60 µL de solução do radical AAPH (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha*) em

concentração 108 mg/mL dissolvido em água destilada. A fluorescência foi monitorada a cada 56 segundos durante 90 min, em FluorímetroFluostarOptimo (BMG LABTECH, Alemanha) a 37 °C e com filtro de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm. Os valores ORAC foram calculados pela diferença entre a área sob a curva de decaimento da fluorescência de cada amostra e do branco (net AUC). As equações de regressão entre net AUC e concentração antioxidante foram calculadas para todas as amostras. As medições realizadas em triplicata, e os resultados expressos como μmol equivalente em Trolox/g de substrato ou μmol equivalente em Trolox/g de padrão.

4.3.2 Ensaio DPPH

A análise de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi realizada conforme método descrito por Macedo et al. (2011) com modificações. As amostras foram diluídas em etanol 100% para concentração final de 10 mg/mL. O meio reacional consistiu em 50 μL de amostra diluída disposta em placas transparentes de 96 poços e 150 μL da solução de DPPH (0,2 mmol/L em etanol) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). O branco de referência foi preparado com 50 μL de água e 150 μL de solução de DPPH. A absorbância foi medida a 520 nm por 36 min em leitor de placa (BMG Labtech, Alemanha). O padrão Trolox® (6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, *AcrosOrganics, Belgica*) foi preparado em etanol nas concentrações de 10-200 $\mu\text{M/L}$ e determinado conforme as condições citadas anteriormente. A atividade antioxidante foi calculada a partir da equação obtida por regressão linear das determinações de DPPH do padrão Trolox®. As medições realizadas em triplicata, e os resultados expressos como μmol equivalente em Trolox/g de amostra.

4.4 Cultivo celular

Foram utilizadas as linhagens de hepatocarcinoma humano (HepG2) doadas pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA-UNICAMP, e adenocarcinoma de cólon humano (HT29), doadas pelo Laboratório de Biologia Molecular e Farmacologia da Universidade São Francisco. A linhagem HT29 foi cultivada em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - Sigma-Aldrich®), e a HepG2 foi cultivada em Minimum Essential Medium (MEM - Sigma-Aldrich®); ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, NY, USA), 10 mL/L de penicilina/estreptomicina (Gibco BRL, NY, USA) e 2,2 g/L de NaHCO³, pH 7,4. As células foram cultivadas até atingirem cerca de 80% de confluência, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, e depois incubadas em presença da amostra por 5 horas antes dos ensaios pretendidos, a fim de garantir que as emulsões se mantivessem estáveis durante o período de tempo determinado para o ensaio.

4.4.1 Avaliação da viabilidade celular em linhagens de HT29 e HepG2

Uma possível ação citotóxica dos azeites emulsionados sobre a linhagem celular HT29, células de membrana intestinal humana, foi investigada pelo método MTT. Este consiste em um teste de redução do sal de tetrazólio (MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) descrito por Mosmann (1983), modificado por Ribeiro-Dias et al. (2000).

Diferentes solventes foram testados a fim de identificar aquele que apresentasse menor grau de toxicidade como veículo do óleo. A amostra foi dispersa em DMSO e diferentes surfactantes na proporção de 9:1 (v:v), cuja concentração inicial foi de 40 mg/ml (NCI/ NIH, 2013 adaptado). Foram testadas soluções de Tween 20:DMSO, Tween 80:DMSO e glicerol:DMSO a fim de constituir um sistema de emulsão com o azeite em meio de cultura DMEM. Cada sistema emulsionado foi agitado vigorosamente em em UltraTurrax (Ultra Turrax Tube Drive Control Workstation -IKA®) a 4000 rpm por 5 minutos. Após agitação, cada emulsão foi adicionada em tubos eppendorf de 2mL, e mantidas em repouso até observarmos sinais de coalescência.

Após definição do sistema de emulsificação mais estável e seguro, o ensaio de viabilidade foi realizado com as células de HepG2. Alíquotas de 100 µL de suspensão celular, na densidade de 1×10^5 células/mL, foram transferidas para placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, para adaptação e adesão, as células foram expostas às amostras emulsionadas (filtradas em filtro de 0,20 µm) nas concentrações de 0,5 a 2 mg/mL, então, a placa foi incubada novamente por 5 horas, tempo definido conforme os testes de estabilidade do sistema de emulsão.

Na sequência, o sobrenadante foi desprezado, e adicionou-se 10 µL de solução MTT na concentração de 5 mg/mL em cada compartimento da placa, e então, as células foram incubadas por 3 h (37°C, 5% CO₂), em seguida adicionou-se 100 µL de sulfato de dodecil de sódio 10% (SDS) em HCl 0,01M. A placa foi mantida por 18 h, a 37°C, 5% de CO₂. Um agitador de placa foi utilizado para homogeneizar a solução, e por fim, a absorbância foi lida a 540nm, usando leitor de microplaca. Controles positivos de viabilidade celular foram avaliados, assim como um controle da citotoxicidade dos solventes da amostra. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.4.2 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes em hepatócitos humanos

4.4.2.1 Obtenção do extrato enzimático bruto

O método utilizado foi de Alía et al. (2006) com modificações. As células HepG2 foram mantidas em garrafas de cultivo até atingirem aproximadamente 80% de confluência quando foram tripsinizadas, centrifugadas (1500 rpm por 10 min), ressuspensas em meio completo e transferidas para placas de 6cm de diâmetro, sendo a densidade inicial de células semeadas nas placas de $0,8 \times 10^6$ cel/mL. As placas foram mantidas em incubadora até confluência de 70 a 80%.

Na sequência, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS - *Phosphate-Buffered Saline* pH 7,4), e iniciou-se o tratamento com as amostras de azeite, com período de exposição de 5 horas. Em seguida, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS gelado, descoladas com o auxílio de um “scraper” e coletadas em 3 mL de PBS gelado. O volume de suspensão celular coletado foi centrifugado (1350 rpm a 4 °C,

por 10 min), o sobrenadante foi descartado e, o precipitado formado resuspendido em 200 μ L de solução de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 contendo 0,1% de Triton X-100[®]. Então, as células foram sonicadas em banho de ultrassom por 5 minutos, e mantidas em banho de gelo até as análises. Uma alíquota foi removida para medir concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1976).

É importante ressaltar que houve controle de temperatura durante todo o procedimento, a fim de manter ao máximo a integridade das enzimas na solução final denominada extrato enzimático bruto.

4.4.2.2 Determinação de proteínas totais pelo Método de Bradford

A determinação de proteínas totais foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Em um tubo eppendorf adicionou-se 78 μ L de solução tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 contendo 0,1% de Triton X-100[®], seguido de 2 μ L do extrato enzimático bruto. A solução foi homogeneizada delicadamente por pipetagem, para não desnaturar as proteínas. O tubo foi mantido em banho de gelo até o momento do plaqueamento. Esta etapa resultou em uma diluição de 40 vezes a concentração inicial. da amostra.

Na placa de 96 poços, transparente, adicionou-se 10 μ L do extrato enzimático bruto diluído e 200 μ L de solução de Bradford. O branco da reação foi feito substituindo-se a amostra por tampão. A placa foi mantida em agitador de placa durante 5 minutos, a fim de manter o meio reacional homogêneo. Em seguida foi realizada leitura da absorbância a 630 nm em leitor de placa (Microplate Reader KHB ST360). As análises foram feitas em triplicata. A curva de calibração foi realizada usando uma solução padrão de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin* – BSA), nas concentrações de 0,6-0,01 mg/mL, e os resultados expressos em mg de proteína por mL de amostra. As medições foram realizadas, no mínimo, em triplicata das amostras, e duplicata do padrão.

4.4.2.3 Determinação da atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pelo Kit Ensaio Catalase – CAT 100 Sigma[®], cujo princípio do método baseia-se na mensuração da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com o decréscimo da absorbância a 520 nm, mensurado em leitor de

placa (Microplate Reader KHB ST360). Uma curva padrão de H₂O₂ foi realizada nas concentrações de 0,0125-0,075 µmol/mL, as análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em µmol/min/mL.

4.4.2.4 Determinação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo Kit Ensaio SOD Sigma®, cujo princípio do método baseia-se na mensuração da diminuição da cor do meio reacional ao longo tempo a 440 nm em leitor de placa (Microplate Reader KHB ST360); a variação da cor ocorre devido à reação de óxido-redução entre o ânion superóxido e o sal WST-1 (sal tetrazólio altamente solúvel em água) gerando o produto formazan, a substância cromófora em meio aquoso. A absorbância é proporcional à quantidade do ânion superóxido, e a atividade da SOD atua como fator de inibição sobre o radical. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em % inibição/mg proteína.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como médias e desvio padrão, e a significância estatística das diferenças entre os valores analisados foi medida através do Teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do Teste de Tuckey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Foram utilizados os softwares estatísticos SigmaPlot 11.0® e GraphPad Prism 5.0®.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização das amostras

6.1.1 Caracterização do perfil de ácidos graxos

A Tabela 2 apresenta o perfil de ácidos graxos das amostras analisadas.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (% área relativa) de amostras de azeite de oliva identificadas como extra virgem

Simbologia Nome usual	Arbequina RS	Arbequina MG	Arbequina Med	Maria da Fé	Gallo®
Saturados					
C14:0 mirístico	0,039±0,003 ^b	0,037±0,001 ^{bc}	0,051±0,002 ^a	0,032±0,003 ^c	0,033±0,003 ^c
C16:0 palmítico	16,719±0,007^a	13,577±0,016^c	14,043±0,168^b	11,840±0,011^e	12,836±0,011^d
C17:0 margárico	0,087±000 ^b	0,076±000 ^d	0,111±0,002 ^a	0,062±0,002 ^c	0,082±0,001 ^c
C18:0 esteárico	1,817±0,028^b	1,520±0,033^c	2,491±0,329^a	1,946±0,009^b	2,814±0,030^a
C20:0 araquídico	0,390±0,006 ^{bc}	0,383±0,006 ^c	0,420±0,007 ^a	0,398±0,004 ^b	0,416±000 ^a
C22:0 behênico	0,132±0,003 ^{ab}	0,155±0,019 ^a	0,140±0,003 ^{ab}	0,153±0,003 ^a	0,123±0,007 ^b
C24:0lignocérico	0,064±0,003 ^b	0,062±0,001 ^b	0,073±0,001 ^b	0,099±0,008 ^a	0,107±0,001 ^a
Monoinsaturado					
C16:1 palmitoléico	0,133±0,001 ^c	0,183±0,002 ^a	0,140±0,003 ^b	0,112±0,002 ^d	0,114±0,003 ^d
C17:1 heptadecenóico	0,204±0,001 ^b	0,209±0,002 ^b	0,224±0,003 ^a	0,085±000 ^d	0,159±0,004 ^c
C18:1 oléico	63,580±0,063^d	67,631±0,122^c	67,779±0,269^c	72,965±0,027^a	70,449±0,862^b
C20:1 gadoléico	0,294±0,010 ^b	0,387±0,008 ^a	0,315±0,003 ^b	0,394±0,002 ^a	0,292±0,013 ^b
Poliinsaturado					
C18:2 linoléico	9,881±0,012^a	9,579±0,068^a	9,414±0,282^a	7,670±0,006^b	8,215±0,783^b
C18:3 linolênico	0,628±0,002 ^c	0,828±0,006 ^b	0,634±0,029 ^c	1,335±0,006 ^a	0,756±0,086 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatística entre as amostras (p <0,05).

A composição majoritária do azeite de oliva corresponde aos triacilgliceróis, cujo ácido graxo principal é o ácido oleico. Quanto ao teor de oleico a amostra Maria da Fé apresentou a maior concentração ($72,965 \pm 0,027\%$) bem próxima ao valor encontrado na amostra referência Gallo[®] ($70,449 \pm 0,862\%$). As amostras monovarietais ArbequinaMG ($67,631 \pm 0,122\%$) e ArbequinaMed ($67,779 \pm 0,269\%$) foram estatisticamente iguais entre si, enquanto que a ArbequinaRS ($63,580 \pm 0,063\%$) apresentou a menor concentração de ácido oleico.

Em relação aos ácidos graxos poliinsaturados, os azeites monovarietais possuem quantidades estatisticamente iguais de ácido linoleico, sendo superiores às demais amostras (Tabela 2). Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFA) tem sido relacionados com vários benefícios à saúde. Estudos afirmam que a inclusão de *PUFAs* da série 3, como o ácido linolênico, na dieta humana acarreta, principalmente, em redução da mortalidade em decorrência de doenças cardiovasculares (KUAH et al., 2015).

Os dois principais ácidos graxos saturados do azeite de oliva são o ácido esteárico e palmítico. O perfil de saturados, de modo geral, foi muito parecido entre as amostras, sendo um pouco menor na variedade Maria da Fé ($1,946 \pm 0,009\%$ e $11,840 \pm 0,011\%$, respectivamente).

De acordo com o Codex Alimentarius (CODEX STAN 33, 2013) há limites definidos de concentração dos ácidos graxos em azeites de oliva extra virgem comercializados no Brasil, os valores estipulados para o ácido palmítico (C16:0) pode variar de 7,5-20,0%; para o ácido esteárico (C18:0) de 0,5-5,0 %; para o ácido oleico (C18:1) de 55-83%; e para o ácido linoleico (C18:2) de 3,5-21,0 %. Assim, os resultados encontrados nos azeites nacionais, bem como, nos azeites importados analisados no presente trabalho, encontram-se em conformidade com o estabelecido pela legislação.

Ballus et al. (2014) caracterizaram 11 amostras de azeites de oliva extra virgem de caráter monovarietal produzidos no sudeste do Brasil em dois anos de safra, 2010 e 2011. Uma das variedades analisadas foi a Arbequina, que apresentou um percentual de ácido oleico de $75 \pm 1\%$ em 2010 e $75,7 \pm 0,1\%$ no ano seguinte, concentrações um pouco superiores às encontradas neste trabalho. Quanto aos ácidos graxos poliinsaturados, as concentrações de ácido linoleico foram de $9,6 \pm 0,1\%$ em 2010 e $9,71 \pm 0,05\%$ em 2011, valores muito próximos às Arbequinas escolhidas para atual pesquisa. Os principais ácidos

graxos saturados, palmítico e esteárico, apresentaram percentuais de 11 ± 1 e $1,63\pm 0,04\%$, respectivamente, no ano de 2010; e $9,8\pm 0,2$ e $1,69\pm 0,05\%$, respectivamente, em 2011. Estes resultados foram semelhantes aos valores obtidos na amostra Maria da Fé, que apresentou os menores teores de ácidos graxos saturados dentre todas as amostras analisadas.

Cecchi e Alfei (2013) analisaram azeites de oliva extra virgem de caráter monovarietal derivados de 11 cultivares diferentes de oliva da região de Marche, na Itália. Os autores encontraram percentual de ácido oleico variando de $71,7\pm 3,6$ a $79,8\pm 4\%$, quanto ao ácido linoleico, o percentual mínimo encontrado foi de $4,2\pm 0,2\%$ e o máximo de $9,0\pm 0,4\%$. O perfil dos principais ácidos saturados variou de $11,2\pm 0,6\%$ a $14,7\pm 0,7\%$ para o ácido palmítico, e de $1,9\pm 0,1\%$ a $3,9\pm 0,2\%$ de ácido esteárico. Observa-se que as amostras brasileiras apresentam teor de ácido oleico um pouco menor em relação às diversas variedades de azeites italianos analisados por Cecchi e Alfei.

Reiterando o que afirmam Reboredo-Rodríguez et al. (2014), o perfil da concentração de ácidos graxos saturados e insaturados de azeite pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo área de produção, latitude, clima e maturação do fruto, mas principalmente pela variedade da oliva.

Rondanini et al. (2014) avaliaram a composição química do azeite de oliva derivado de diversas variedades bem conhecidas de oliva, inclusive a Arbequina, cultivadas em três diferentes regiões da Argentina por duas estações consecutivas. Os resultados mostraram que o ácido oleico foi o mais importante ácido graxo insaturado em todas as variedades, com valores iniciais em torno de 70%, valor próximo ao das variedades Maria da Fé e Gallo[®].

Estudos apontam os ácidos graxos insaturados, especialmente, o ácido oleico como um agente protetor no desenvolvimento de doenças crônicas como diversos tipos de câncer (MOON, BATIREL E MANTZOROS, 2014) e doenças cardiovasculares, (PERONA et al., 2006; SCODITTI et al., 2014).

Fontana, Spolaore e De Laureto (2013) reforçam o papel biológico do ácido oleico na prevenção do desenvolvimento de neoplasias, em um estudo com o ácido oleico complexado à proteína do leite, a lactalbumina, esta com a função de promover maior solubilidade do ácido graxo. Assim, esse lipídeo poderia exercer sua atividade apoptótica sobre as células tumorais, devido à desestruturação de membranas biológicas, e consequentemente, em perda de função celular.

Considerando-se o ácido graxo oleico, as três amostras de Arbequina analisadas nesta pesquisa são parecidas entre si, especialmente a ArbequinaMG e ArbequinaMed. Além disso, a variedade nacional Maria da Fé apresentou a maior concentração de ácido oleico, sendo até superior à amostra Gallo[®].

6.1.2 Determinação de pigmentos: carotenóides e clorofila totais

Os teores de carotenoides totais e clorofila encontrados nas amostras estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Conteúdo de pigmentos em azeites de oliva extra virgem expresso em mg/kg de amostra.

AMOSTRA	CAROTENOS TOTAIS (mg β -caroteno /kg amostra)	CLOROFILA TOTAL (mg feofitina a /kg amostra)
ArbequinaRS	4,42 $\pm$ 0,03 ^b	23,29 $\pm$ 0,04 ^b
ArbequinaMG	3,68 $\pm$ 0,04 ^d	19,20 $\pm$ 0,01 ^c
ArbequinaMed	3,87 $\pm$ 0,04 ^c	16,36 $\pm$ 0,02 ^d
Maria da Fé	11,59 $\pm$ 0,07 ^a	36,50 $\pm$ 1,08 ^a
Gallo [®]	3,71 $\pm$ 0,01 ^d	19,12 $\pm$ 0,11 ^c

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (p <0,05).

É interessante observar que a variedade Maria da Fé, desenvolvida pela EPAMIG, destacou-se em termos de pigmentos totais (11,59 $\pm$ 0,07 mg/kg de carotenoides e 36,50 $\pm$ 1,08 mg/kg de clorofila), apresentando valores superiores à todas amostras testadas. Ainda assim, o conteúdo de carotenos nas amostras analisadas, se comparadas a outros óleos, não as caracterizam como fontes dietéticas importantes de carotenóides. Como por exemplo, o óleo da polpa de buriti, cuja concentração de carotenóides pode variar de 225 a 1700 μ g/g de óleo, predominantemente da fração β -caroteno (SILVA, 2009 e FERREIRA et al., 2011).

Pigmentos de clorofila desempenham atividade antioxidante importante para a estabilidade do óleo, e assim, maior *shelf life*, enquanto que os carotenóides exercem atividade biológica importante para a saúde humana. Os resultados apresentaram baixas concentrações de carotenóides totais nas amostras de azeite de oliva, o que sugere que estes compostos não tenham influenciado, de modo significativo, nos ensaios de sequestro de radical e de atividade enzimática.

Pigmentos de cloroplastos, clorofila e carotenóides, são os principais responsáveis pela cor do azeite, variando desde amarelo esverdeado a amarelo dourado (MOTILVA e ROMERO, 2010).

Bengana et al. (2013) afirmam que o grau de maturação da oliva é a chave para a concentração de pigmentos no azeite. Os mesmos autores realizaram a caracterização dos principais compostos presentes no azeite de oliva de variedade Chemlal, cujas datas de colheita do futo variaram de novembro de 2011 a janeiro de 2012. Os resultados mostraram que entre as colheitas de dezembro e janeiro houve significativo decréscimo (16 ± 1 para 13 ± 1 mg/kg) no conteúdo de clorofila nos azeites analisados. Essa redução durante a maturação explica-se pela transformação da clorofila (a) e clorofila (b) em feofitina (a) e feofitina (b), respectivamente, o que causaria a mudança na cor do azeite de verde para amarela. A concentração de carotenóides não mostrou diferença significativa entre as amostras analisadas quanto ao período de maturação da oliva.

Cayuela et al. (2014) determinaram a concentração de pigmentos nas amostras de azeite de oliva (n=208) a fim de comparar diferentes técnicas espectrométricas utilizadas. Os resultados médios encontrados foram $17,23 \pm 15,83$ mg/Kg e $11,08 \pm 7,46$ mg/Kg de clorofila e carotenoides totais, respectivamente. Os autores concluíram que a técnica de determinação de pigmentos utilizando UV-VIS pode ser adequada tanto para carotenos, quanto para teor de clorofila total. Portanto, os resultados do presente trabalho são compatíveis com a literatura. Conforme abordado, os pigmentos são importantes indicadores de qualidade físico-química do azeite de oliva, porém, não temos rastreabilidade das amostras quanto às condições de cultivo e colheita, o que impossibilita maiores argumentos para comparação.

6.1.3 Caracterização e quantificação de tocoferóis

O método utilizado para análise de tocoferóis permitiu identificar a fração alfa-tocoferol, cuja concentração foi significativa em relação à sensibilidade do método para todas as amostras. Os resultados estão na Tabela 4.

Tabela 4. Conteúdo de α - tocoferol expresso em mg /kg de amostra.

AMOSTRA	α -tocoferol (mg/Kg amostra)
ArbequinaRS	379,20 $\pm$ 0,69 ^a
ArbequinaMG	323,70 $\pm$ 1,50 ^b
ArbequinaMed	312,30 $\pm$ 1,49 ^{bc}
Maria da Fé	358,40 $\pm$ 0,35 ^a
Gallo [®]	300,60 $\pm$ 0,76 ^c

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

As duas amostras com maiores teores de α -tocoferol foram as amostras brasileiras ArbequinaRS (379,20 $\pm$ 0,69 mg/kg) e Maria da Fé (358,40 $\pm$ 0,35 mg/kg). Estas superaram os azeites monovarietais de Minas Gerais e, inclusive, do Mediterrâneo; e ainda a referência Gallo[®], que apresentou o menor teor de α -tocoferol (300,60 $\pm$ 0,76 mg/kg), aproximadamente 20% menor em relação à ArbequinaRS.

As concentrações de α -tocoferol encontradas neste trabalho são compatíveis com a literatura, como mostram os resultados de Ballus et al. (2014). Estes autores realizaram a caracterização de 17 azeites de oliva extra virgem monovarietais produzidos no Brasil, e quantificaram as frações α , β , e γ -tocoferol; os resultados descritos demonstraram que a concentração de α -tocoferol variou de 29 a 233 mg/kg. Assim, observa-se que as amostras analisadas no presente trabalho apresentaram maiores concentrações de α -tocoferol em relação à outras variedades brasileiras descritas por Ballus et al. (2014).

Benito et al. (2013) caracterizaram azeites de oliva extra virgem derivados da variedade Arbequina originária da Espanha, no período de 2008 a 2010, cultivadas com rigoroso controle de oferta de água, e observaram as modificações promovidas pelo grau de

maturação das olivas nos azeites correspondentes. O teor de α -tocoferol mostrou-se diminuído nos azeites derivados das olivas com grau de amadurecimento avançado, com diferença significativa entre os anos e período de colheita. Os autores observaram que no início do processo de maturação do fruto, em 2008, uma maior concentração de α -tocoferol foi obtida, 496,4 mg/kg de azeite; enquanto que o menor conteúdo observado foi ao final do processo de maturação: 182,0 mg/kg de azeite. Assim, os valores obtidos no presente trabalho poderiam sugerir que os azeites da variedade Arbequina e as marcas importadas são derivadas de olivas com grau intermediário de maturação, supondo-se que as condições de cultivo foram semelhantes.

Os benefícios dos tocóis à saúde já estão bem estabelecidos na literatura, estes compostos contribuem para a integridade de membranas celulares e prevenção da aterogênese (TRABER et al., 2007; XU et al., 2014), atuam na prevenção de estresse oxidativo e apresentam potencial efeito neuroprotetor (MORRIS et al., 2015). Anwar et al. (2013) afirmam que o conteúdo de α -tocoferol é a fração mais abundante de tocoferol em azeites de oliva, cuja ingestão diária recomendada para indivíduos adultos é de 15 mg (IOM, 2010).

6.1.4 Determinação de Fenólicos Totais

A determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu é amplamente utilizada para caracterizar as propriedades antioxidantes de diferentes amostras. Os resultados experimentais para as amostras testadas apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 5. Conteúdo de fenólicos totais expressos em mg de ácido gálico equivalente/Kg de amostra (mg AGE /kg).

AMOSTRA	Fenólicos totais (mg AGE /Kg)
ArbequinaRS	168,51±0,82 ^a
ArbequinaMG	97,70±3,76 ^b
ArbequinaMed	165,64±1,41 ^a
Maria da Fé	89,00±1,42 ^{bc}
Gallo [®]	83,36±0,82 ^c

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

Observa-se que entre as amostras de variedade Arbequina, a cultivar do Rio Grande do Sul e do Mediterrâneo apresentaram o maior teor de fenólicos totais, cujos resultados foram estatisticamente iguais entre si e superiores às demais amostras analisadas.

É interessante salientar que não houve diferença estatística significativa entre as amostras ArbequinaMG e Maria da Fé, variedades de oliva distintas cultivadas sob as mesmas condições climáticas (Minas Gerais apresenta clima tropical) forneceram azeites com teores similares de compostos fenólicos totais. Em contrapartida, o cultivo de uma mesma variedade de oliva em regiões geográficas diferentes (ArbequinaRS e ArbequinaMed.), porém, com condições climáticas parecidas (Rio grande do Sul e Mediterrâneo apresentam clima temperado) resultou em um maior acúmulo de compostos fenólicos totais.

Homapour et al. (2014) realizaram a caracterização química de três variedades de azeite de oliva (Zard, Rowghani, Mari) cultivadas em duas regiões diferentes do Irã. Os pesquisadores puderam observar que a composição química, incluindo o conteúdo de fenólicos totais, variou de maneira significativa (p<0,05) em uma mesma amostra quando cultivada em regiões diferentes, cuja faixa de concentração de fenólicos foi de 104±4 mg/kg e 180±3 mg/kg. Estes resultados corroboram para os valores encontrados neste estudo, e para a hipótese de que, além do tipo de cultivar, as condições climáticas de cultivo

da oliveira têm efeito importante na composição química da oliva, e consequentemente, no azeite produzido.

A concentração de fenólicos totais pode variar de $67,04 \pm 33,05$ mg GA/kg a de $356,65 \pm 59,20$ mg GA/kg de acordo com a variedade e período do ano de cultivo, segundo estudos de Ocakoglu et al. (2009) com diferentes variedades de azeite de oliva extra virgem, de caráter monovarietal produzidos na Turquia. Neste sentido, os valores de fenólicos encontrados nas amostras analisadas estão em conformidade com a literatura, destacando-se a amostra brasileira ArbequinaRS, com concentrações superiores de fenólicos totais, e estatisticamente igual à ArbequinaMed.

Inarejos-García et al. (2010) afirmam que os componentes minoritários de maior importância do azeite de oliva extra virgem são os compostos fenólicos, juntamente com os tocoferóis, devido às suas propriedades antioxidantes e nutracêuticas.

Grande parte do potencial biológico dos azeites é atribuída à ação dos fenólicos. Segundo Segura-Carretero et al. (2010) o provável efeito destes fitoquímicos está na prevenção de várias doenças associadas com o estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares e degenerativas, além de diversos tipos de câncer. Os autores destacam ainda a capacidade dos fenólicos em modular a atividade enzimática, embora este efeito não esteja totalmente esclarecido pelos estudiosos.

Cicerale, Lucas e Keast (2010) abordaram em seu trabalho de revisão diversos estudos envolvendo humanos e animais, os quais demonstraram que os compostos fenólicos do azeite têm efeitos biológicos potencialmente benéficos decorrentes de atividades antimicrobianas, antioxidantes e antiinflamatórias.

A fim de tentar compreender os mecanismos envolvidos na ação dos fenólicos sob o processo inflamatório, Camargo et al. (2014) conduziram um estudo com 49 pacientes portadores de Síndrome Metabólica, os quais foram divididos em grupos, em que cada grupo teve intervenção padronizada na dieta e suplementação de azeite de oliva, com diferentes teores de fenólicos, classificados em alto (398 mg/kg), médio (149 mg/kg) e baixo teor de fenólicos totais (70 mg/kg).

Após coleta de sangue dos pacientes e análise do plasma, os pesquisadores puderam observar que o consumo de azeite de oliva virgem rico em fenólicos limitou o aumento dos níveis de LPS (lipopolissacarídeo), diversas proteínas de estresse inflamatório (TLR4,

SOCS3), ativação do fator de transcrição celular NF- κ B e IL6 (interleucina 6), IL1B e a expressão do gene da enzima cicloxigenase 1, concluindo que os compostos fenólicos do azeite virgem foram capazes de reduzir a resposta inflamatória pós-prandial em associação com redução dos níveis de LPS no plasma.

6.1.5 Análise cromatográfica de fenólicos: tirosol e hidroxitirosol

A Tabela 6 apresenta os resultados da análise dos principais fenólicos simples presentes nas amostras de azeite de oliva.

Tabela 6. Concentração de fenólicos tirosol e hidroxitirosol, em amostras de azeite de oliva, expressa em mg de fenólico /kg de amostra.

Amostra	Fenólicos (mg /kg)	
	Hidroxitirosol	Tirosol
ArbRS	1,28 $\pm$ 0,03 ^c	1,55 $\pm$ 0,02 ^c
ArbMG	1,47 $\pm$ 0,03 ^c	2,05 $\pm$ 0,04 ^d
ArbMed	7,02 $\pm$ 0,47 ^a	3,25 $\pm$ 0,21 ^c
Maria da Fé	1,04 $\pm$ 0,02 ^c	4,35 $\pm$ 0,05 ^b
Gallo [®]	4,53 $\pm$ 0,08 ^b	5,13 $\pm$ 0,11 ^a

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

Observa-se que entre as variedades Arbequina, a amostra de origem mediterrânea apresentou maior concentração de hidroxitirosol, seguida da marca referência Gallo[®]. Quanto ao fenólico tirosol, a ArbequinaMed também mostrou-se superior às demais Arbequinas; no entanto, dentre todas as amostras, a Gallo[®] apresentou maior conteúdo de tirosol. É importante destacar que a variedade Maria da Fé, cujo conteúdo de tirosol foi bem próximo ao da marca referência.

Os resultados obtidos estão em concordância com as faixas de concentração encontradas na literatura. Como no estudo de Franco et al. (2014), em que os autores

caracterizaram o perfil fenólico de diferentes variedades de azeites de oliva produzidos na região mediterrânea. A quantidade de tirosol encontrada variou de $1,95 \pm 0,29$ a $6,25 \pm 0,58$ mg/kg de amostra, e $1,34 \pm 0,41$ a $3,31 \pm 1,19$ mg/kg de hidroxitirosol.

Um estudo de Ballus et al. (2015) quantificou diversos fenólicos presentes em diferentes variedades de azeite de oliva virgem produzidos em duas regiões do Brasil, Sul e Sudeste. Os autores observaram variação na concentração de fenólicos entre as regiões, entre as variedades e entre o período de safra das olivas. Os valores de tirosol e hidroxitirosol encontrados na variedade Arbequina foi $1,2 \pm 0,1$ mg/kg e $1,5 \pm 0,1$ mg/kg, respectivamente, no azeite produzido na região Sudeste. E, na região Sul a concentração foi desde não quantificáveis (NQ) até $2,4 \pm 0,2$ mg/kg de tirosol e $0,2 \pm 0,01$ a $1,6 \pm 0,1$ mg/kg de hidroxitirosol. Assim, observa-se que a maioria das amostras avaliadas no presente trabalho está em conformidade com as análises de Ballus et al. (2015). Vale destacar a variedade Maria da Fé, cuja concentração de tirosol mostrou-se superior às demais amostras nacionais e em relação à amostra mediterrânea.

A análise de fenólicos tirosol e hidroxitirosol resultou em valores significativamente menores em comparação ao conteúdo de fenólicos totais das amostras analisadas, especialmente, em relação aos azeites brasileiros. O que levanta dois questionamentos: 1) Quais seriam os fenólicos mais representativos nos azeites nacionais? 2) Os azeites nacionais que apresentam perfil fenólico diferente apresentariam propriedades antioxidantes tão importantes quanto os azeites europeus?

A literatura atribui vários efeitos benéficos à saúde pelo consumo de azeite de oliva extra virgem, destacando-se o papel biológico dos fenólicos tirosol e hidroxitirosol. Estes ácidos fenólicos são considerados os compostos mais ativos com importantes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (CAÑUELO et al., 2012; FORTES et al. 2013; CLAUDIA et al., 2014).

Um estudo *in vitro* com células hepáticas primárias de ratos investigou o efeito dos fenólicos tirosol, hidroxitirosol e oleuropeína sobre o metabolismo lipídico dos hepatócitos. Os autores concluíram que estes fenólicos, especialmente o hidroxitirosol, podem promover uma diminuição na síntese hepática de lipídeos, efeito relacionado ao potencial hipolipidêmico desses compostos já reportado na literatura (PRIORE, SICULELLA E GNONI, 2014).

Mosele et al. (2014) investigaram o metabolismo da microbiota intestinal sobre determinados compostos fenólicos de azeite de oliva, incluindo tirosol e hidroxitirosol. Os autores observaram, por meio de testes *in vitro*, que esses compostos não foram metabolizados pelas bactérias do cólon intestinal, e portanto, poderiam desempenhar papel importante na prevenção de doenças do cólon.

Lamy et al. (2014) afirmam que o poder antioxidante de fenólicos de azeite já está bem caracterizado, no entanto sua atividade antiangiogênica ainda é desconhecida. Os autores justificam que fatores de crescimento vascular endotelial desencadeiam processos que regulam a angiogênese tumoral, e por isso conduziram um estudo *in vitro* a fim de investigar o efeito de determinados compostos do azeite de oliva sobre a angiogênese. Dentre os fenólicos analisados, o hidroxitirosol mostrou maior efeito inibitório sobre a síntese de vasos sanguíneos, assim como o ácido oleico, reiterando as propriedades de prevenção no desenvolvimento de tumores celulares malignos.

A literatura científica internacional apresenta diversos estudos sobre fenólicos de azeite envolvendo os compostos tirosol e hidroxitirosol, porém, pode haver outros fenólicos, ainda desconhecidos, com atividade biológica importante. Neste sentido, seria interessante a avaliação da atividade biológica utilizando modelos de ensaio mais complexos, *in vivo*, a fim de investigar o efeito das amostras nacionais tanto em termos de atividade antioxidante, quanto em relação à resposta enzimática.

6.2 Avaliação da atividade antioxidante por sequestro de radicais livres

Pode-se afirmar que a avaliação da bioatividade de compostos naturais é complexa, e não existe um único ensaio ou combinação de ensaios necessariamente ideal, dada a ampla diversidade de compostos químicos presentes em alimentos (POWER, JAKEMAN E FITZGERALD, 2013).

As principais espécies reativas de oxigênio são radical peroxil ($\text{RCOO}^\bullet$), ânion superóxido (O_2^{-2}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$), e peroxinitrato ($\text{ONOO}^\bullet$). Os antioxidantes podem atuar através de diferentes mecanismos contra essas espécies químicas altamente reativas. Cada método possui determinada precisão e reprodutibilidade, mas em termos de capacidade antioxidante os

resultados podem apresentar valores consideravelmente diferentes entre um método e outro. Assim, devem ser realizados mais de um teste *in vitro* a fim de avaliar o potencial antioxidante de amostras de interesse considerando que os ensaios são modelos que variam em diferentes aspectos, o que torna difícil a comparação entre os diversos métodos utilizados (PÉREZ-JIMÉNEZ et al. 2008; BADARINATH et al., 2010; ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013; TAN e LIM; 2015).

6.2.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC

Os valores do potencial antioxidante das amostras determinados pelo ensaio ORAC estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Equivalentes Trolox ($\mu\text{mol/g}$) e faixas de linearidade para as concentrações de 5 a 20 mg/mL de amostra.

Amostra	Equivalente de Trolox ($\mu\text{mol/g}$)	Faixa de concentração de amostra (mg/mL)	Slope	Intercept	R ²
ArbequinaRS	115,92 $\pm$ 3,58 ^a	5-15	3,3404	4,61	0,99
ArbequinaMG	110,04 $\pm$ 7,83 ^a	5-15	2,676	8,7502	0,98
ArbequinaMed	113,85 $\pm$ 7,18 ^a	5-15	2,8399	8,1955	0,99
Maria da Fé	125,60 $\pm$ 9,59 ^a	5-15	2,7444	9,9305	0,99
Gallo [®]	115,85 $\pm$ 18,10 ^a	10-20	1,6337	24,577	0,99

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (p <0,05).

Alguns autores atribuem o efeito antioxidante do azeite de oliva na sua forma íntegra ao possível sinergismo entre os compostos bioativos presentes, e ainda, entre estes compostos e o sistema de emulsão em que o azeite possa estar inserido (MEDINA et al., 2002; CASTELO-BRANCO E TORRES, 2011). Este efeito poderia explicar os resultados estatisticamente iguais para todas as amostras frente ao radical peroxil, apesar de os azeites analisados apresentarem diferenças estatísticas em sua composição química.

O princípio do ensaio ORAC fundamenta-se na transferência de um átomo de hidrogênio da substância antioxidante para o radical peroxil formado a partir da reação do APPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com o oxigênio. Este método mensura a habilidade de sequestro de radical através da diminuição da fluorescência, e envolve o uso de fontes sintéticas de radicais livres, um antioxidante e uma sonda molecular oxidável (BRISTE E RAFIQUZZAMAN, 2013; TAN e LIM, 2015ALAM). Este ensaio é, atualmente, a opção preferencial de indústrias de alimentos e do ramo farmacêutico (POWER et al., 2013), e permite simular, de modo mais próximo possível, a reação antioxidante em um organismo humano em condições ideais de pH e temperatura.

Apesar desta preferência no uso do ORAC, trata-se de um método que utiliza solução aquosa nas reações e por isso exige adaptações para avaliação de óleos. Por essa razão não é o método mais usado para amostras oleosas, conforme a literatura. A maior parte dos trabalhos científicos apresenta o ORAC como método de avaliação de extratos metanólicos de amostras oleosas, os quais apresentam a fração hidrofílica dos óleos, e não do óleo na sua forma íntegra. Dessa forma, foi difícil situar nossos resultados comparando-os com a literatura existente.

Alguns pesquisadores realizam a encapsulação do óleo em ciclodextrina, como os estudiosos Koncza e Roulle (2011). Estes autores avaliaram as propriedades biológicas das frações do óleo de frutos silvestres, utilizando a fração lipofílica encapsulada, a fim de definirem o potencial antioxidante total (ORAC_{total}) das amostras. Os resultados mostraram que o percentual de atividade antioxidante da fração hidrofílica foi significativamente superior para todas as amostras devido à concentração de compostos fenólicos. Os componentes da fração lipofílica que mais contribuíram para a atividade antioxidante foram o α -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol e a luteína.

O método padrão para amostras de caráter hidrofílico utiliza metanol como meio reacional, o que limita sua aplicação ao se trabalhar com amostras lipofílicas. Os ensaios de ORAC para amostras de azeite, ou derivados da indústria da oliveira, aplicam o método tradicional com metanol a partir da fração hidrofílica da amostra (ou extrato metanólico) contendo componentes de caráter mais polar (Sánchez et al., 2007; Uribe et al., 2014). Como no estudo de Hayes et al. (2011), que avaliou a atividade antioxidante de extrato de folha de

oliveira, dentre outras amostras, a fim de comparar diferentes métodos de sequestro de radical.

Ainda que a literatura demonstre grande variação nos métodos de avaliação de atividade antioxidante, Power et al. (2013) afirmam que ensaios *in vitro* são ferramentas de pesquisa importantes na avaliação da atividade antioxidante global de uma amostra quando usado em combinação com ensaios de biodisponibilidade e biomarcadores.

6.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

Segundo a literatura, o método de sequestro de radicais livres mais utilizado para amostras oleosas é o DPPH em meio alcoólico (VASILESCU et al., 2015; SEBAALY et al., 2015).

Os resultados da análise de atividade antioxidante via sequestro de radical DPPH estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Equivalentes Trolox ($\mu\text{mol/g}$ amostra) pelo método DPPH

Amostra	Equivalente Trolox ($\mu\text{mol/g}$)
ArbequinaRS	1790,0 $\pm$ 160,9 ^a
ArbequinaMG	1216,2 $\pm$ 84,7 ^b
ArbequinaMed	1836,2 $\pm$ 181,5 ^a
Maria da Fé	1054,6 $\pm$ 50,1 ^b
Gallo®	1276,7 $\pm$ 131,1 ^b

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (p <0,05).

Observa-se que a atividade antioxidante das amostras ArbequinaMed e ArbequinaRS foi superior às demais, e estatisticamente igual entre si. Enquanto que a ArbequinaMG apresentou a menor atividade antioxidante, equiparando-se à amostra Maria da Fé, também produzida em Minas Gerais, e à marca referência Gallo®.

O teste estatístico de Pearson ($p < 0,05$) permitiu identificar uma correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos totais e o potencial antioxidante para o radical DPPH à nível de 96% ($R = 0,96$), corroborando para as observações anteriores de que apesar dos baixos níveis de fenólicos tirosol e hidroxitirosol, o conteúdo de fenólicos totais resultou em uma boa atividade antioxidante, principalmente para as variedades ArbequinaRS e ArbequinaMed, evidenciando que os fenólicos apresentam afinidade pelo radical DPPH.

Tan e Lim (2015) explicam que método de sequestro de radical livre DPPH segue o princípio de transferência de um elétron seguida da transferência de hidrogênio (método misto), sendo o composto oxidante o indicador de mensuração da reação.

A forma estável do radical livre 1,10-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) é reduzida na presença de antioxidantes, os quais doam um átomo de hidrogênio, originando a forma reduzida de DPPH chamada de hidrazina, ocasionando a mudança de cor do meio reacional de violeta para amarelo, cuja absorbância é mensurada espectrofotometricamente (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013; TAN e LIM; 2015). Em um estudo de revisão sobre métodos antioxidantes in vitro Alam, Bristi e Rafiquzzaman, (2013) afirmam que o método DPPH foi o ensaio mais amplamente usado pelos pesquisadores com o propósito de avaliar a atividade antioxidante.

A maioria dos trabalhos disponíveis nas bases de dados utilizam extratos metanólicos do azeite de oliva, ou de outros óleos, a fim de testar as propriedades antioxidantes da fração hidrofílica do azeite (GORINSTEIN et al., 2003; BUBONJA-SON, GIACOMETTI e ABRAM, 2011; CZERNIAK-SZYDLOWSKA et al., 2011). Métodos que objetivam estudar a capacidade antioxidante de amostras de óleo na sua forma íntegra utilizam solventes de caráter lipofílico como o acetato de etila ou hexano (ESPÍN, SOLER-RIVAS e WICHERS, 2000).

A taxa de reação de fenólicos antioxidantes com o DPPH depende da composição do solvente, podendo diferir em duas ordens de grandeza para o mesmo composto fenólico conforme o caráter químico do meio reacional. Estudiosos explicam que reações em meio alcoólico são mais rápidas do que aquelas em acetato de etila, embora, este último seja amplamente usado em análises de potencial antioxidante de amostras apolares como óleos brutos (PREVC et al.; 2013). Neste trabalho realizamos o ensaio DPPH utilizando os dois tipos de meio reacional, acetato de etila e etanol. E, de fato os resultados obtidos em meio

reacional de caráter apolar foram menores e, não apresentaram boa reprodutibilidade, quando comparados aos resultados dos ensaios que utilizaram solvente de caráter mais polar. Por isso, optamos por considerar os resultados de atividade antioxidante dos azeites em meio etanólico.

Prevc et al., (2013) avaliaram o potencial antioxidante de amostras de óleos não refinados, incluindo o azeite de oliva virgem, utilizando solventes de caráter polar e apolar. Os resultados mostraram que há um aumento significativo na taxa de oxidação e no número de elétrons trocados entre compostos fenólicos e DPPH em meio alcoólico, enquanto que em meio reacional com acetato de etila houve baixa e incompleta oxidação dos polifenóis. Os pesquisadores concluíram, então, que o potencial antioxidante de óleos vegetais brutos é determinado de maneira mais adequada em solvente polar, e com melhores resultados utilizando meio alcoólico tamponado.

6.3 Ensaios celulares

6.3.1 Avaliação da viabilidade celular

A fim de definirmos o melhor sistema de emulsificação dos azeites e faixas seguras de concentração, usamos um modelo celular baseado no ensaio de MTT em linhagem celular de epitélio intestinal (HT29), células bastante sensíveis à exposição de agentes citotóxicos. Os resultados de viabilidade celular frente à intervenção dos solventes testados estão na Tabela 9.

Tabela 9. Viabilidade celular, expressa em porcentagem, da linhagem HT29 (adenocarcinoma coloretal humano) após exposição aos diferentes sistemas de emulsificação por 5 horas.

Emulsificante	Concentração de DMSO (µL/mL)	Concentração de emulsificante (µL/mL)	Viabilidade celular (%)
Glicerol	0,060	0,0060	84,15 ± 0,56
	0,025	0,0025	91,13 ± 2,35
	0,012	0,0012	79,55 ± 6,57
	0,006	0,0006	97,47 ± 4,22
Tween 20	0,060	0,0060	2,11 ± 0,11
	0,025	0,0025	12,00 ± 0,11
	0,012	0,0012	81,29 ± 1,65
	0,006	0,0006	84,27 ± 2,99
Tween 80	0,060	0,0060	76,37 ± 7,91
	0,025	0,0025	86,63 ± 2,32
	0,012	0,0012	85,26 ± 5,73
	0,006	0,0006	81,36 ± 11,04

Uma das limitações em utilizar o óleo na sua forma íntegra para análise do potencial biológico foi definir um eluente que permitisse sua utilização em meio aquoso. Desta forma, realizamos testes com dimetil sulfóxido (DMSO) e três tipos de surfactante (Tween 20, Tween80 e glicerol) buscando estabelecer um sistema de emulsificação de baixa toxicidade.

O DMSO é comumente utilizado como solvente em ensaios celulares para avaliação de lipossolúveis, ainda que apresente alta toxicidade. O DMSO é capaz de interagir com o metabolismo e membranas celulares, resultando em danos severos à integridade da célula, portanto, é preciso respeitar as faixas seguras de concentração desta substância, que podem variar em função da sensibilidade das diferentes linhagens celulares. Assim, não há consenso na literatura quanto à concentração ideal de DMSO que permita a condução segura de ensaios biológicos, embora haja diversos estudos que utilizem este solvente, seja como único eluente ou em solução com outras substâncias (DA VIOLANTE et al. , 2002; OWEN et al., 2012.; MAKINO-WAKAGI et al., 2012.; ESKANDANI et al., 2013).

O ensaio MTT proposto por Mosmann (1983) é um método amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular e toxicidade de diferentes amostras de interesse. Em meio aquoso, o MTT forma uma solução de cor amarela que uma vez reduzido por desidrogenases e agentes redutores presentes em células metabolicamente ativas dão origem ao formazan, um composto insolúvel em água de cor azul-violeta. O produto formazan pode, então, ser extraído com solvente orgânico e estimado espectrofotometricamente. Afirma-se que a quantidade de formazan seja diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Os resultados obtidos indicaram que o emulsificante com maiores taxas de citotoxicidade foi o Tween 20, em concordância com o estudo de Eskandani et al. (2013). Entre o glicerol e o Tween 80, observou-se que o glicerol foi capaz de manter a viabilidade celular em taxas ligeiramente maiores do que o Tween 80 nas maiores concentrações testadas; no entanto, a estabilidade da emulsão produzida com glicerol foi muito menor do que a observada com Tween 80. As emulsões com Tween 80 não apresentaram sinais de coalescência durante 5 horas à temperatura ambiente e na geladeira (4°C), enquanto as

emulsões com glicerol já se apresentavam em duas fases distintas depois de aproximadamente 1 hora.

Assim, definiu-se como o sistema de emulsificação das amostras oleosas mais adequado para os ensaios celulares aquele formado por DMSO e Tween 80, nas proporções 9:1 (v:v), até a concentração máxima de 0,025 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO, de acordo com a sugestão de segurança contra citotoxicidade de DMSO encontrada no trabalho de Violante et al. (2002). As amostras de azeite foram diluídas em concentrações de 0,5 a 3 mg/mL, e o ensaio MTT foi repetido, desta vez, em células da linhagem HepG2. A Figura 6 apresenta o comportamento das amostras no ensaio MTT em que a viabilidade celular significa o percentual de células viáveis em relação ao Controle (100% de viabilidade celular), ou seja, as células que não receberam nenhum tratamento.

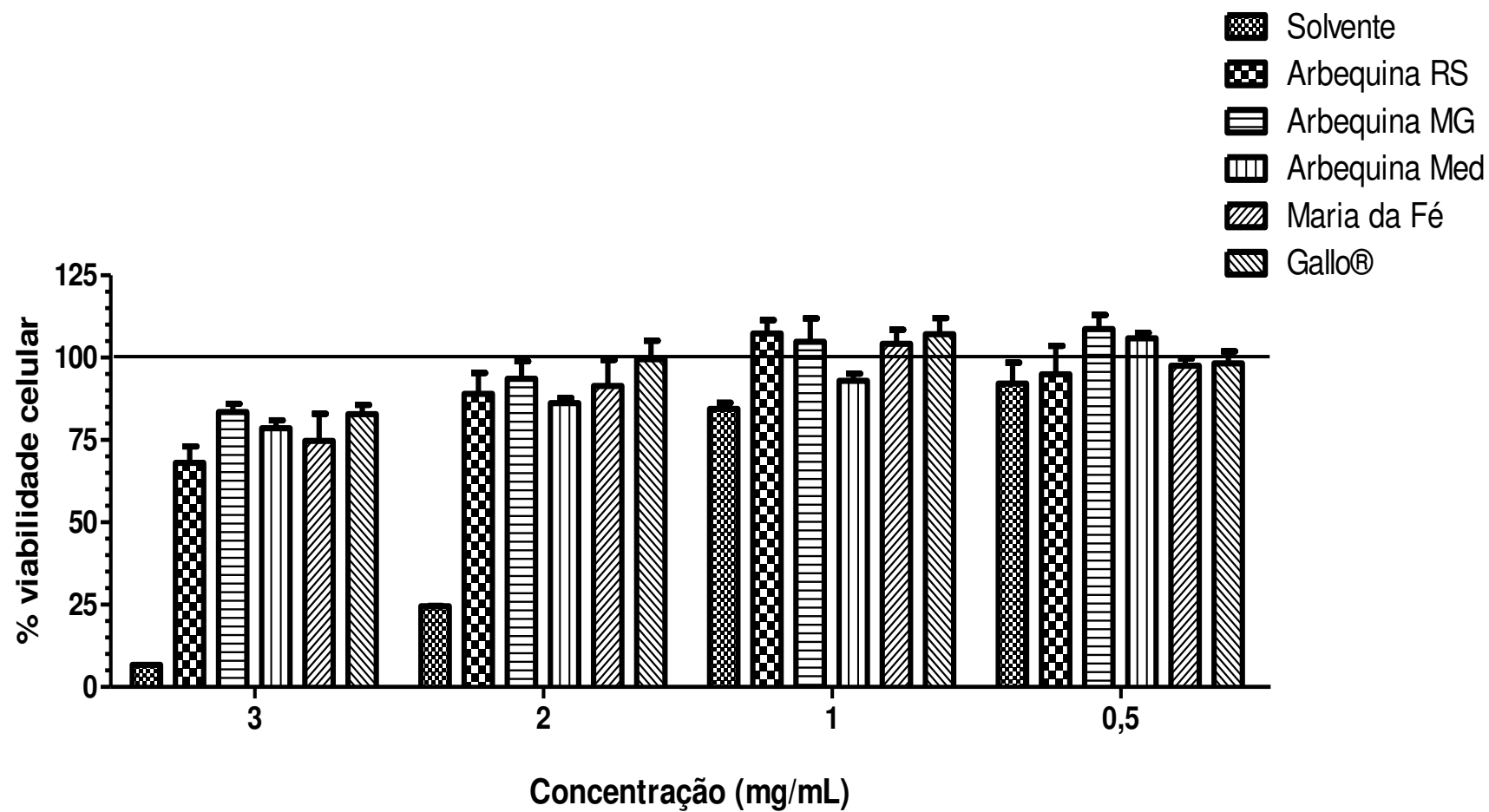


Figura 6. Viabilidade celular, expressa em porcentagem, da linhagem celular HepG2 após 5 h de exposição das amostras nas concentrações de 0,5 a 3mg/mL.

Observa-se que na concentração de 3 mg/mL houve uma significativa redução de células viáveis, cujos valores apresentaram-se abaixo de 85% de viabilidade para todas as amostras, exceto as células tratadas com a ArbequinaRS, cuja viabilidade foi menor que 75%. Foi realizado o teste de toxicidade do sistema de emulsificação sem amostra, denominado “solvente”, ou controle do sistema; este causou uma drástica redução de viabilidade celular de HepG2, menor que 10% na maior concentração testada.

A partir da concentração de 2 mg/mL, observou-se um aumento na viabilidade celular de aproximadamente 90 a 100% para todas as amostras testadas, exceto o sistema controle de solvente, cuja viabilidade ainda foi baixa.

Consideramos que uma variação de aproximadamente 15% em relação aos 100% de viabilidade no ensaio de MTT pode representar uma variação na taxa metabólica das células, não necessariamente sob a viabilidade celular. Dessa forma, a única concentração testada que indicou perda de viabilidade celular (ou maior toxicidade) foi de 3 mg/mL. Sendo assim, os ensaios celulares foram conduzidos com a menor e a maior concentração de azeite na faixa segura para hepatócitos: 0,5 e 2 mg/mL.

6.3.2 Avaliação da capacidade de modulação da atividade enzimática da Catalase e Superóxido Dismutase

A atividade da catalase foi avaliada através da mensuração da taxa de desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um método tradicional e bem estabelecido como descrito por Cohen, Kim e Ogwu (1996). Estes autores descrevem duas técnicas que podem ser usadas para medir H_2O_2 por colorimetria, sendo a absorção de H_2O_2 na faixa de baixa radiação ultravioleta (240nm) ou através da mensuração do H_2O_2 residual.

A Figura 7 apresenta os resultados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ referentes à atividade da enzima catalase nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL das amostras testadas.

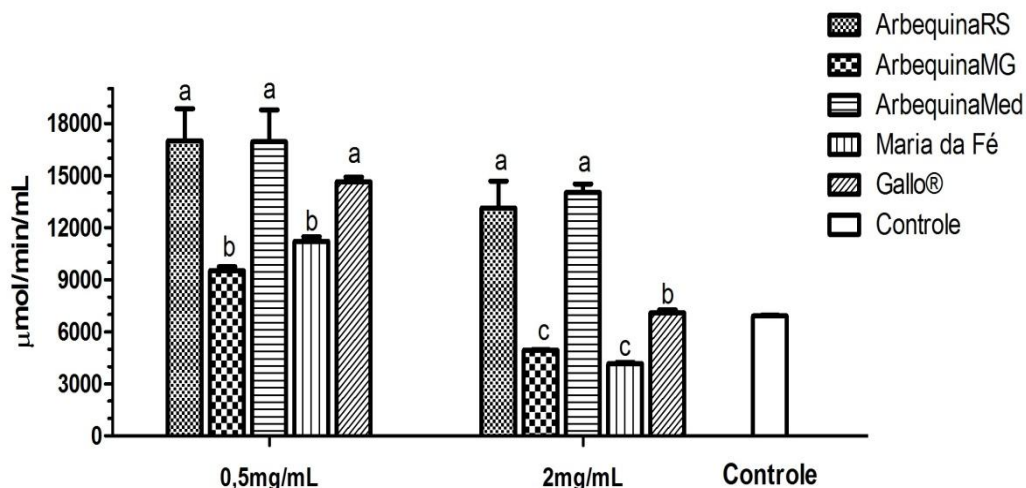


Figura 7. Atividade de catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) nas concentrações de 0,5 e 2 mg/mL. *Letras iguais na mesma concentração correspondem a amostras iguais ($p < 0,05$).

**O Controle representa a atividade de catalase nas células não tratadas com amostras.

Há uma relação concentração-resposta inversa entre a atividade enzimática da catalase e o aumento da concentração de azeite, uma vez que a ativação enzimática decai com o aumento da concentração de amostra.

O teste Dunnet ($p < 0,05$) apontou que na concentração de 0,5 mg/mL todas as amostras testadas desencadearam atividade enzimática estatisticamente diferente do Controle (grupo sem nenhuma intervenção de amostra), o mesmo resultado foi observado com o aumento da concentração para 2 mg/mL, exceto para a amostra Gallo® ($7099 \pm 157 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$), apresentando-se estatisticamente igual ao grupo Controle ($6926 \pm 45 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$).

Os resultados demonstram que a atividade da catalase foi significativamente elevada em todos os grupos, quando comparadas às células Controle na presença de óleos emulsificados na concentração de 0,5 mg/mL. Observou-se um incremento de 145% na atividade enzimática em relação ao grupo de células controle, desencadeados pelas amostras ArbequinaRS ($16.985 \pm 1865 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) e ArbequinaMed ($16.939 \pm 1834 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$).

Já na concentração de 2 mg/mL de azeite, observou-se uma redução na atividade enzimática para todas as amostras se comparadas à concentração de 0,5 mg/mL. A

ArbequinaMG e a Maria da Fé causaram as maiores reduções, atingindo valores de atividade enzimática menores até do que os observados para as células Controle.

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, constituindo-se uma proteção importante contra produtos tóxicos da respiração celular. Compreende um grupo de três classes de enzimas que se caracterizam em distintas proteínas enoveladas e diferentes íons metálicos catalíticos: SODCu/Zn, SODMn/SODFe e SODNi (PERRY et al., 2010).

A Figura 8 mostra os resultados obtidos quanto à atividade da enzima superóxido dismutase em percentual de inibição por miligrama de proteína (% inibição/mg proteína).

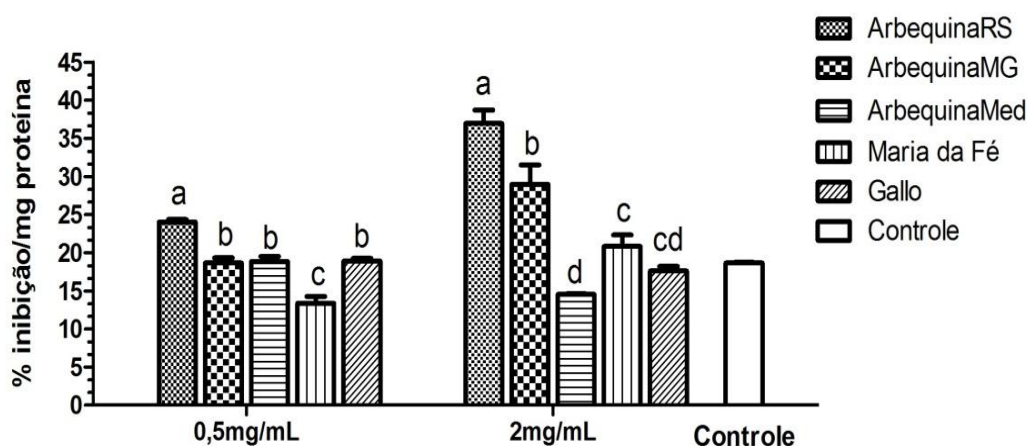


Figura 8. Atividade de SOD (% inibição/ mg proteína) nas concentrações de 0,5 e 2mg/mL.

*Letras iguais na mesma concentração correspondem a amostras iguais ($p < 0,05$).

**O Controle representa a atividade da SOD nas células não tratadas com amostra.

O teste Dunnet ($p < 0,05$) mostrou que na concentração de 0,5 mg/mL apenas as amostras ArbequinaRS e Maria da Fé desencadearam resposta enzimática estatisticamente diferente das células Controle, cuja atividade foi 18,65 % inibição/mg proteína. Quanto a concentração de 2 mg/mL as amostras ArbequinaRS, ArbequinaMG e Maria da Fé desencadearam atividade enzimática estatisticamente diferentes das células Controle,

enquanto que os resultados referentes à marca Gallo[®] e à ArbequinaMed mostraram-se estatisticamente iguais ao Controle.

Destacam-se os azeites derivados da variedade Arbequina do Rio Grande do Sul e de Minas Gerais, os quais causaram maior ativação enzimática da SOD na concentração de 2 mg/mL. Na concentração de 0,5 mg/mL de amostra, os percentuais de inibição por miligrama de proteína foram: ArbequinaRS 24,01%, ArbequinaMG 18,66%, ArbequinaMed 18,86% , Maria da Fé 13,39% e Gallo[®] 18,93%. Na concentração de 2 mg/mL as amostras ArbequinaRS (36,96% inibição /mg proteína), ArbequinaMG (28,97% inibição /mg proteína) e Maria da Fé (20,84% inibição /mg proteína) apresentaram valores de atividade superiores em relação à menor concentração testada, enquanto que as amostras ArbequinaMed (14,51% inibição /mg proteína) e Gallo[®] (17,6% inibição /mg proteína) tiveram menor atividade quando comparadas à concentração de 0,5 mg/mL.

Os resultados de atividade da SOD nas células hepáticas frente à intervenção com os azeites emulsificados demonstram que na concentração de 0,5 mg/mL as amostras, em geral, não causaram nenhuma modulação na atividade enzimática, apresentando valores similares, ou menores, aos obtidos nas células Controle. A única exceção foi a ArbequinaRS, que exerceu uma elevação de aproximadamente 28% sob a atividade da SOD, em relação ao Controle.

Já na intervenção com as amostras na concentração de 2 mg/mL, observamos um aumento da atividade da SOD na ordem de 98,22%, 55,33% e 11,78% em relação ao Controle, causados pelas amostras ArbequinaRS, ArbequinaMG e Maria da Fé, respectivamente.

Zhao et al. (2014) avaliaram a atividade antioxidante dos principais compostos bioativos produzidos pelo fungo endofítico *Aspergillus fumigates*, presente em leguminosas denominadas ervilhas selvagens. Os estudiosos trataram células HepG2 com diferentes extratos do fungo, destacando-se o extrato em acetato de etila, o qual promoveu um aumento significativo da atividade das enzimas SOD, catalase e glutathione redutase. Nesta mesma linha de pesquisa, Gao et al. (2012) ao estudarem as propriedades antioxidantes do fungo *Chaetomium globosum* isolado de uma leguminosa, popularmente conhecida como feijão-guandu, obtiveram resultados semelhantes, e de caráter concentração-dependente. Ambos, os autores defendem a teoria de que esse aumento de atividade enzimática

acarretaria em efeito benéfico à saúde, uma vez que implica no incremento da ação das enzimas contra as espécies reativas de oxigênio, e maior proteção às células contra a citotoxicidade e genotoxicidade dessas espécies fúngicas.

Ainda não há consenso na literatura quanto à interpretação dos ensaios de atividade enzimática *in vitro*. Estudos recentes tem avaliado o potencial antioxidante de diferentes amostras via ensaios de sequestro de radical e/ou medindo a atividade de enzimas específicas *in vitro* e *in vivo* (COLOMEU et al., 2014; KIM et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015).

Pareek et al. (2013) avaliaram as atividades antioxidante e hepatoprotetora de um extrato etanólico da *Fagonia schweinfurthii* (Hadidi) em células HepG2 de fígado de rato com hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Os autores explicam que o Hadidi, nome comumente usado para a planta, é uma espécie presente em solos mais áridos e desérticos, cujo potencial terapêutico é bem documentado na literatura médica devido à concentração de fitoquímicos importantes, destacando-se flavonas e terpenóides glicosilados. Assim, os pesquisadores conduziram um ensaio com o uso de um agente agressor para as células, o tetracloreto de carbono, acarretando em diminuição significativa na atividade das enzimas SOD, catalase e glutathione reduzida no tecido hepático dos ratos. Já os animais tratados com o extrato de Hadidi apresentaram um aumento da atividade antioxidante das enzimas (SOD, CAT e GHS), indicando que os compostos bioativos dessa planta foram capazes de diminuir o dano oxidativo ao tecido hepático, em parte por estímulo da atividade das enzimas hepáticas antioxidantes. Fatores considerados positivos uma vez que houve uma ativação na resposta do sistema de defesa celular, como o observado no presente estudo *in vitro* para as amostras ArbequinaRS e ArbequinaMed, principalmente.

Com base nestas argumentações, a maior parte dos pesquisadores tem assumido que a ativação das enzimas catalase e SOD representa uma atuação positiva no papel antioxidante da amostra testada. Consequentemente, a redução da atividade das mesmas enzimas indicaria uma ação deletéria de agentes citotóxicos.

Dessa forma, nota-se que a ação das amostras sobre a atividade da catalase, na concentração de 0,5 mg/mL, foi muito positiva. Todas as amostras levaram ao aumento da atividade da catalase em relação às células Controle, com destaque para a ação dos azeites

ArbequinaRS, ArbequinaMG e Gallo[®]. A hipótese que levantamos para a observada redução da atividade da catalase diante das maiores concentrações de amostra se relaciona ao estresse celular causado pelo aumento da concentração dos agentes emulsificantes que acompanham o azeite nestes ensaios.

A catalase é uma enzima antioxidante endógena amplamente distribuída no meio intracelular, presente no interior das organelas e no citoplasma, o que possibilitaria uma resposta mais amplificada desta enzima a fatores de estresse celular, como os agentes emulsificantes utilizados como veículo de amostra; ainda que esses fatores não tenham causado perda de viabilidade celular, como observado no MTT. Contudo, as amostras ArbequinaRS e ArbequinaMed destacaram-se na maior manutenção de atividade da catalase, sofrendo reduções de apenas 22,74% e 17,22%, respectivamente, após o aumento da concentração das amostras. Este efeito sugere que o potencial antioxidante desses azeites foi superior ao dos demais, sobrepujando de forma mais eficiente os efeitos deletérios dos emulsificantes.

Já no caso das respostas relativas à atividade enzimática da SOD frente às amostras, observamos um comportamento mais resiliente na modulação da atividade desta enzima. Na menor concentração testada, com exceção de uma sutil ativação causada pela ArbequinaRS, as amostras quase não afetaram o padrão de atividade da SOD em relação às células Controle. Apenas quando a concentração de óleo foi aumentada para 2 mg/mL, foi possível observar uma elevação expressiva na atividade da SOD causada pelas amostras ArbequinaRS e ArbequinaMG.

De forma geral, nos ensaios de ativação do sistema antioxidante endógeno de hepatócitos, dentre os azeites testados os de maior potencial biológico foram os brasileiros, com importante destaque para a variedade Arbequina produzida no Rio Grande do Sul, ArbequinaRS.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o Brasil é um país em potencial para o desenvolvimento da olivicultura e produção de azeites de qualidade. De um modo geral, o azeite produzido no Rio Grande do Sul, a partir da cultivar Arbequina, apresentou resultados importantes em termos de atividade biológica quando comparados ao azeite referência de mercado Gallo[®], e até mesmo ao de mesma variedade de origem mediterrânea e em relação à cultivar Arbequina de Minas Gerais, o que sugere potencial de mercado para os azeites do Sul.

Vale destacar a significativa concentração de α -tocoferol presente na amostra desenvolvida em Minas Gerais, a variedade Maria da Fé, uma vez que os tocoferóis desempenham alta atividade biológica como vitamina E. Destacamos ainda a composição em fenólicos totais das amostras brasileiras, e sua correlação positiva com a resposta antioxidante via sequestro de radical DPPH. No entanto, não foram encontradas concentrações expressivas de tirosol e hidroxitirosol, destacados na literatura internacional como os principais fenólicos com atividade biológica, sugerindo que outros componentes com potencial atividade antioxidante podem estar presentes nas amostras brasileiras. É interessante acrescentar que a marca de azeite mais popular no mercado nacional, amostra Gallo[®], não foi a mais ativa em termos de atividade antioxidante.

A produção de azeite de oliva no Brasil ainda é incipiente, a monocultura de azeite no país encontra-se em fase de adequação, porém, considerando-se que o mercado de azeites de oliva é cada vez mais ascendente, é válido o incentivo e aperfeiçoamento do cultivo de oliva e produção de azeite no país, visto os benefícios à saúde no consumo deste produto.

Este foi um estudo inicial de investigação do potencial biológico dos azeites nacionais, pesquisas futuras podem incluir um maior número de compostos bioativos, e utilização de diferentes métodos a fim de investigar as propriedades biológicas dos azeites, e levantar dados importantes de apelo comercial.

8. SUGESTÕES DE ESTUDOS FUTUROS

- Investigar o perfil de fenólicos dos azeites brasileiros de modo a identificar os compostos desconhecidos.
- Testar outras formas de emulsificação mais fisiológicas, de menor toxicidade e maior estabilidade.
- Avaliar a atividade de outras enzimas importantes, como glutathione peroxidase, formas reduzida e oxidada.
- Avaliar o efeito das amostras de azeite de oliva em modelos *in vitro* e *in vivo* por desafios de estresse oxidativo (H_2O_2 , CCl_4 , luz UV).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M.N; BRISTI, N.J; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, p. 143–152, 2013.

ALÍA, M.; MATEOS, R.; RAMOS, S.; LECUMBERRI, E.; BRAVO, L.; GOYA, L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal Nutrition*, v. 45, p. 19–28, 2006.

AL-OTOOM, A.; AL-ASHEH, S.; LLAWZI, M.; MAHSHI, K.; ALZENATI, N.; BANAT, B.; ALNIMR, B. Extraction of oil from uncrushed olives using supercritical fluid extraction method. *J. of Supercritical Fluids*, v. 95, p.512–518, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Resolução *Diário Oficial da União: Poder Executivo*, de 23 de setembro de 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/260905_reg.htm. Acesso em: 20/10/2013.

ANWAR,P.; BENDINI, A.; GULFRAZ, M.; QURESHI, R.; VALLI, E.; DI LECCE,G. NAQVI, S.M.S.; TOSCHI, T.G. Characterization of olive oils obtained from wild olive trees (*Olea ferruginea* Royle) in Pakistan. *Food Research International* v. 54, p.1965–1971, 2013.

AOCS: American Oil Chemists Societ: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist´s Society. 5º ed., Champain: AOCS, 2004.

AOCS: American Oil Chemists Society: Official Method .*Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils*, 6º ed., 2009.

AOQUI, M. *Caracterização do óleo da polpa de macaúba (Acrocomia aculeata) e azeite de oliva (Olea europaea L.) virgem extra e seus efeitos sobre dislipidemia e outros parâmetros sanguíneos, tecido hepático e mutagênese em ratos Wistar*. 2012. (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2012.

APARICIO-RUIZ, R.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, I.; GANDUL-ROJAS, B. Thermal degradation kinetics of lutein, β -carotene and β -cryptoxanthin in virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, p. 811-820, 2011

ARAGHIPOUR, N.; COLINEAUA, J.; KOOTA, K.; AKKERMANS, W.; MANUEL, J.; ROJAS, M.; BEAUCHAMP, J.; WISTHALER, A.; MÄRK, T.D.; GUILLOU, G.D.C.; MANNINAF, L.; RUTHB, S.V. Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chemistry*, v. 108, p. 374–383, 2008.

BADARINATH, A.V., RAO, K.M., CHETTY, C.M.S., RAMKANTH, V., RAJAN, T.V.S., GNANAPRAKASH, K. A review on *in-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal PharmTech Research*, v.2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.

BAKHOUCHE, A.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; JOVEN, J.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Research International*, v. 50, p. 401–408, 2013.

BALLUS, C. *Otimização da separação de compostos fenólicos por eletroforese capilar e análise da composição em ácidos graxos de azeite de oliva extravirgem*. 2010. (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2010.

BALLUS, C.A.; MEINHART, A.D.; CAMPOS, JR., SILVA, L.F.O.; OLIVEIRA, A.F.; GODOY, H.T. A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. *Food Research International*, v. 62, p. 74–83, 2014.

BALLUS, C.A.; QUIRANTES-PINÉ, R.; BAKHOUCHE, A.; SILVA, L.F.O.; OLIVEIRA, A.F.; COUTINHO, E.F.; CROCE, D.M.; SEGURERA-CARRETERO, A.; GODOY, H.T. Profile of phenolic compounds of Brazilian virgin olive oils by rapid resolution liquid chromatography coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (RRLC–ESI–TOF–MS). *Food Chemistry*, v.170, p. 366–377, 2015.

BARP, J.A.; ARAUJO, A.S.; FERNANDES, T.R.; RIGATTO, K.V.; LLESUY S, BELLO-KLEIN A. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Medical Biologic Research*, v.35, p.1075–81, 2002.

BAYRAM, B.; ESATBEYOGLU, T.; SCHULZE, N.; OZCELIK, B.; FRANK, J.; RIMBACH, G. Comprehensive analysis of polyphenols in 55 extra virgin olive oil by HPLC–ECD and their correlation with antioxidant activities. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 67, p. 326–336, 2012.

BELTRÁN, G.; JIMÉNEZ, A.; RIOB, C. D.; SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, L.; UCEDAA, M.; AGUILERA, M.P. Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 633–639, 2010.

BENGANA, M.; BAKHOUCHE, A.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; AMIR, Y.; YOUYOU, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Research International*, v. 54, p.1868–1875, 2013.

BENITO,M.; LASA,J.M.; GRACIA,P.; ORIA, R.; ABENOZA,M.; VARONA L.; SÁNCHEZ-GIMENO, A.C. Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.93, p.2207–2220, 2013.

BOGANI, P.; GALLI, C.; VILLA, M.; VISIOLI, F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, v. 190, p. 181–186, 2007.

BOSQUE-SENDRA, J. M.; DE LA MATA-ESPINOSA, P.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GONZÁLEZ-CASAD, A.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, F. P.; GARCÍA-TOLEDO, H. Stability for olive oil control materials. *Food Chemistry*, v. 125, p. 1418–1422, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248, 1976.

BUBONJA-SONJE,M.; GIACOMETTI,J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, v.127, p. 1821–1827, 2011.

CAMARGO, A.; RANGEL-ZUÑIGA, O.A.; HARO,C.; MEZA-MIRANDA, E.R.; PEÑA-ORIHUELA,P.; MENESES, M.E.; MARIN, C.; YUBERO-SERRANO, E.M.; PEREZ-MARTINEZ, P.; DELGADO-LISTA, J.; FERNANDEZ-REAL, J.M.; M. DE CASTRO, M.D.L.; TINAHONES, F.J.; LOPEZ-MIRANDA,J.; PEREZ-JIMENEZ, F. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food Chemistry*, v. 162, p. 161–171, 2014.

CAÑUELO, A.; GILBERT-LÓPEZ, B.; PACHECO-LIÑÁN, P.; MARTÍNEZ-LARA, E.; SILES, E.; MIRANDA-VIZUETE, A. Tyrosol, a main phenol present in extra virgin olive oil, increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* , v.133, p. 563–574, 2012.

CAPONIO, F.; GIARNETTI, M.; SUMMO, C. PARADISO, V.M.; COSMAI, L.; GOMES, T. A comparative study on oxidative and hydrolytic stability of monovarietal extra virgin olive oil in bakery products. *Food Research International*, v.54, p.1995-2000, 2013.

CARILLON, J.; DEL RIO, D.; TEISSÈDRE, P. L.; CRISTOL, J. P.; LACAN, D.; ROUANET, JM. Antioxidant capacity and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of a melon concentrate rich in superoxide dismutase. *Food Chemistry*, v. 135, p.1298–1302, 2012.

CASTELO-BRANCO, V.N; TORRES, A.G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição*, v. 24, p.173-187, 2011.

CAYUELA, J.A.; YOUSFI, K.; M. CARMEN MARTÍNEZ, C.; GARCÍA, J.M. Rapid determination of olive oil chlorophylls and carotenoids by using visible spectroscopy. *Journal American Oil Chemists Society*, v. 91, p. 1677–1684, 2014.

CECCHI, T.; ALFEI, B. Volatile profiles of Italian monovarietal extra virgin olive oils via HS-SPME–GC–MS: Newly identified compounds, flavors molecular markers, and terpenic profile. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2025–2035, 2013.

CICERALE, S.; LUCAS, L.; KEAST, R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, v.11, p. 458-479, 2010.

CLODOVEO, M.L.; HBAIE, R.H. Beyond the traditional virgin olive oil extraction systems: Searching innovative and sustainable plant engineering solutions. *Food Research International*, v.54, p.1926–1933, 2013.

CODEX STAN 33. **Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils**. Codex Alimentarius Commission, FAO/WHO. Revision 2 (2003). Amendment in 2013. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/> Acesso em 21 de abril de 2015.

COHEN, G.; KIM, M.; OGWU, V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 67, p. 53-56, 1996.

COLOMEU, T.C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C.B.B.; SCHUMACHER, N.S.G; MARÓSTICA JR., M.R.; MELETTI, L.M.M.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *International Immunopharmacology*, v.18, p.106–115, 2014.

COVAS, M. I.; FITÓ, M.; OLHA KHYMENETS, O.; DE LA TORRE. R. Olives and olive oil in health and disease prevention. In: *The bioavailability of olive phenolic compounds*. Edited by: Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson . Elsevier, 2010, p.699-703.

CZERNIAK-SZYDLOWSKA, A.; TROKOWSKI, K.; KARLOVITS, G.; SZLYK,E. Effect of refining process on antioxidant capacity, total contents of phenolics and carotenoids in palm oils. *Food Chemistry*, v.129, p. 1187-1192, 2011.

DA VIOLANTE,G.; ZERROUK,N.; RICHARD, I.; PROVOT,G.; CHAUMEIL,J.C.; ARNAUD, P. . Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (dmsO) on caco2/tc7 colon tumor cell cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, n. 12, p. 1600 - 1603, 2002.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, v.61, p.1-31, 1995.

DEL GIOVINE, L.; FABIETTI, F. Cooper chlorophyll in olive oils: identification and determination by LIF capillary electrophoresis. *Food Control*, v.16, p. 267-272, 2005.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.), 2011. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/sistemas/sistemas-16/11_mercados_e_comercializacao.htm> Acesso em: janeiro de 2015.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Estudo com Oliveiras é apresentado ao COI: Portal EMBRAPA, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2018655/estudo-com-oliveiras-e-apresentado-ao-coi>> Acesso em: janeiro de 2015.

EPAMIG – Empresa de Pesquisas Agropecuárias de Minas Gerais. Azeite de oliva: conceitos, classificação, usos e benefícios para a saúde humana. *Circular Técnica*, 2008. Disponível em: http://www.epamig.br/index.php?option=com_content&task=view&id=1683&Itemid=68

EROL, Ö.; ARDA, N.; ERDEM, G. Phenols of virgin olive oil protects nuclear DNA against oxidative damage in HeLa cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 3475-3479, 2012.

ESKANDANI, M; HAMISHHKAR, H; DOLATABADI, J.E.N. Cyto/Genotoxicity study of Polyoxyethylene (20) sorbitan Monolaurate (Tween 20). *DNA and Cell Biology*, v. 32, n. 9, p. 498-503, 2013.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J. Characterization of the total radical scavenger capacity of vegetable oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p.648-656, 2000.

ESPÍNOLA, F.; MOYA, M.L.; FERNÁNDEZ, D.; CASTRO, E. Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *Journal of Food Engineering*, v. 92, p.112–118, 2009.

FABIANI, R.; ROSIGNOLI, P.; BARTOLOMEO, A. FUCCELLI, R.; SERVILI, M.; MOROZZI, G. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenols induce apoptosis on HL60 cells. *Food Chemistry*, v. 125, p. 1249-1255, 2011.

FAO/WHO. CODEX STAN 33. *Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils*. Codex Alimentarius Commission, 2013.

FERREIRA, B. S; ALMEIDA, C. G; FAZA, L. P; ALMEIDA, A; DINIZ, C. G; SILVA, V. L; GRAZUL, R. M; HYARIC, M. L. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*, v.16, p.5875-5885, 2011.

FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, A.; ROCAMORA-REVERTE, L.; QUIRANTES-PINÉ, R.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; FERRAGUT, J. A. Application of nanoLC-ESI-TOF-MS for the metabolomic analysis of phenolic compounds from extra-virgin olive oil in treated colon-cancer cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 63, p. 128-34, 2012.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. *Food Chemistry*, v. 130, p. 797–813, 2012.

FERRÍS-TORTAJADA, J.; BERBEL-TORNERO, O.; GARCÍA-CASTELL, J.; ORTEGA-GARCÍA, J.A.; LÓPEZ-ANDREU, J.A. Factores dietéticos asociados al cáncer de próstata. Beneficios de la dieta mediterránea. *Actas Urológicas Españolas*, v.36, n.4, p. 239-245, 2012.

FERRUZZI, M.G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, v. 27, p. 1–12, 2007.

FONTANA, A.; SPOLAORE, B.; DE LAURETO, P.P. The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1834, p. 1125–1143, 2013.

FORTES, C.; GARCÍA-VILAS, J.A. QUESADA, A. R.; MEDINA, M.A. Evaluation of the anti-angiogenic potential of hydroxytyrosol and tyrosol, two bio-active phenolic compounds of extra virgin olive oil, in endothelial cell cultures. *Food Chemistry*, v. 134 p. 134–140, 2013.

FRANCO, A.N.; GALEANO-DÍAZ, T.; LÓPEZ, O.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.G.; SÁNCHEZ, J.; DE MIGUEL, C. GIL, M.V.; MARTÍN-VERTEDOR, D. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, v. 163, p. 289–298, 2014.

GALEANO-DÍAZ, T.; ACEDO-VALENZUELA, M.I.; SILVA-RODRÍGUEZ, A. Determination of tocopherols in vegetable oil samples by non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) with fluorimetric detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, p. 24–30, 2012.

GAO, F.; KINNULA, V.L.; MYLLARNIEMI, M.; OURY, T.D. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, v.10, p. 343–354, 2008.

GAO, Y.; ZHAO, J.; ZU, Y.; FU, Y.; LIANG, L.; LUO, M.; WANG, W.; EFFERTH, T. Antioxidant properties, superoxide dismutase and glutathione reductase activities in HepG2 cells with a fungal endophyte producing apigenin from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Food Research International*, v.49, p.147–152, 2012.

GORINSTEIN,S.; MARTIN-BELLOSO,O.; KATRICH,E.; LOJEK,A.; MILAN CÍC,M.; GLIGELMO-MIGUEL,N.; HARUENKIT,R.; PARK,YS.; JUNG, ST.; TRAKHTENBERG,S. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 14, p.154–159, 2003.

GU, J.; ZHENG, Z.; YUAN, J.; ZHAO, B.; WANG, C.; ZHANG, L.; XU,Q.; YIN,G.; FENG, L.; JIA, X. Comparison on hypoglycemic and antioxidant activities of the fresh and dried *Portulaca oleracea L.* in insulin-resistant HepG2 cells and streptozotocin-induced C57BL/6Jdiabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 161, p. 214–223, 2015.

GUILLÉN, N.; ACÍN, S.; NAVARRO, M.A.; SURRA, J.C.; ARNAL, C.; LOU-BONAFONTE, J.M.; MUNIESA, P.; MARTÍNEZ-GRACIA, M.V.; OSADA, J. Knowledge of the biological actions of extra virgin olive oil gained from mice lacking apolipoprotein E. *Revista Española de Cardiología*, v. 62, n (3), p. 294-304, 2009.

HARTMANN, L; LAGO, L.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, p. 475, 1973.

HAYES, J.E.; ALLEN, P.; BRUNTON, N.; O’GRADY, M.N.; KERRY, J.P. Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea L.*), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, v.126 , p. 948–955, 2011.

HOMAPOUR, M.; GHAVAMI,M.; PIRAVI-VANAK, Z.; HOSSEINI, S.E. Chemical properties of virgin olive oil from Iranian cultivars grown in the Fadak and Gilvan regions. *Grasas y aceites*, v. 65, n (4), p. e043, 2014.

HRNCIRIKI, K.; FRITSCHKE, S. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 106, p. 540-549, 2004.

IOC: Internacional Olive Council, 2014. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures> Acesso em: janeiro de 2015.

INAREJOS-GARCÍA, A. M.; SANTACATTERINA, M.; SALVADOR, M. D.; FREGAPANE,G.; GÓMEZ-ALONSO,S. PDO virgin olive oil quality - Minor components and organoleptic evaluation. *Food Research International*, v. 43, p. 2138–2146, 2010.

IOM - Institute of Medicine of the National Academies. The Dietary Reference Intakes (DRIs), 2010.

Disponível em: <<http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>> Acesso em 21 de abril de 2015.

KALOGEROPOULOS, N.; MYLONA, A.; CHIOU, A.; IOANNOU, M.S.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Retention and distribution of natural antioxidants (α-tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *LWT - Food Science and Technology*, v. 40, p. 1008–1017, 2007.

KUAH, MK. JAYA-RAM, A.; SHU-CHIEN, A.C. The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: Functional characterisation and nutritional regulation of a Fads2 fatty acyl desaturase with Δ4 activity and an Elovl5 elongase in striped snakehead (*Channa striata*). *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1851, p.248–260, 2015.

KHYMENETS, O.; FARRÉ, M.; PUJADAS, M.; ORTIZ, E.; JOGLAR, J.; COVAS, M.I.; DE LA TORRE, R. Direct analysis of glucuronidated metabolites of main olive oil phenols in human urine after dietary consumption of virgin olive oil. *Food Chemistry*, v.126, p. 306–314, 2011.

KIM, D.H., ZHANG, T., LEE, S., DONG, H.H. Fox O₆ in glucose metabolism. *Journal of Diabetes*, v. 5, p.233–240, 2013.

KIM, B.M.; LEE, J.W.; SEO, J.S.; SHIN, K.H.; RHEE, J.S.; JAE-SEONG LEE, J.S. Modulated expression and enzymatic activity of the monogonont rotifer *Brachionus koreanus* Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) in response to environmental biocides. *Chemosphere*, v.120, p. 470-478, 2015.

KLOTZ, L. O.; KRONCKE, K. D.; SIES, H. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 2, p.88–94, 2003.

KONCZA, I.; ROULLE, P. Nutritional properties of commercially grown native Australian fruits: Lipophilic antioxidants and minerals. *Food Research International*, v. 44, p. 2339–2344, 2011.

LAMY, S.; OUANOUI, A.; BÉLIVEAU, R.; DESROSIERS, R.R. Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Experimental Cell Research*, v.322, p. 89 - 98, 2014.

LAURIDSEN, C.; THEIL, P.K.; JENSEN, S.K. Composition of α-tocopherol and fatty acids in porcine tissues after dietary supplementation with vitamin E and different fat sources. *Animal Feed Science and Technology*, v. 179, p. 93– 102, 2013.

LIU, J. J.; GREEN, P.; JOHN MANNA, J.; RAPOPORT, S. I.; SUBLETTE, M. E. Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: Implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. *Brain Research*, v. 1597, p. 220–246, 2015.

LOPEZ, S.; BERMUDEZ, B.; DE LA PAZ, S. M.; JARAMILLO, S.; VARELA, L. M.; ORTEGA-GOMEZ, A.; ABIA, R.; MURIANA, F.J.G. . Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1838, p.1638–1656, 2014.

LOZANO-SÁNCHEZ, J.; CERRETANIB, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETEROA, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science and Technology*, v. 21, p. 201-211, 2010.

MACEDO, J. A., BATTESTIN, V., RIBEIRO, M. L., MACEDO, G. A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, v.126, p.491-7, 2011.

MAKINO-WAKAGI, Y.; YOSHIMURA, Y.; UZAWA, Y.; ZAIMA, N.; MORIYAMA, T.; KAWAMURA, Y. Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 417, p. 880–885, 2012.

MALHEIRO, R.; CASAL, S.; LAMASA, H.; BENTO, A.; PEREIRA, J. A. Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating? *Food Research International*, v. 48, p. 148–154, 2012.

MANAI-DJEBALI, H.; KRICHÈNE, D.; OUNI, Y.; GALLARDO, L.; SÁNCHEZ, J.; OSORIO, E.; DAOUD, D.; GUIDO, F. ZARROUK, M. Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 27, p. 109–119, 2012.

MATEU-DE-ANTONIO, J.; MARÍN-CASINO, M. Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. In: *Olive Oil and Infection*. Cap 37. Elsevier, 2013.

MAHLICLI, F. Y.; ŞEN, Y.; MUTLU, M.; ALTINKAYA, S. A. Immobilization of superoxide dismutase/catalase onto polysulfone membranes to suppress hemodialysis-induced oxidative stress: A comparison of two immobilization methods, *Journal of Membrane Science*, 2014.

MARÍ, M. COLELL, A., MORALES, A.; MONTFORT, C. V.; GARCIA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.12, n.11, 2010.

MEDINA, I.; TOMBO, I.; SATUEÄ-GRACIA, M. T.; GERMAN, J B.; FRANKEL, E. N. Effects of Natural Phenolic Compounds on the Antioxidant Activity of Lactoferrin in Liposomes and Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2392–2399, 2002.

MOON, H.; BATIREL, S.; MANTZOROS, C. S. Alpha linolenic acid and oleic acid additively down-regulate malignant potential and positively cross-regulate AMPK/S6 axis in OE19 and OE33 esophageal cancer cells. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 63, p.1447-1454, 2014.

MORALES, M.T.; G. LUNA, APARICIO, G. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, v. 91, p. 293–301, 2005.

MORRIS, M. C.; SCHNEIDER, J. A.; LI, H.; TANGNEY, C. C.; NAG, S.; BENNETT, D. A.; HONER, W.G.; BARNES, L. L. Brain tocopherols related to Alzheimer's disease neuropathology in humans. *Alzheimer's & Dementia*, v. 11, p. 32–39, 2015.

MOSELE, J.I.; MARTÍN-PELÁEZ, S.; MACIÁ, A.; FARRÁS, M.; VALLS, R.M.; CATALÁN, U.; MOTILVA, M.J. Faecal microbial metabolism of olive oil phenolic compounds: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Molecular Nutrition Food Research*, v.58, p. 1809–1819, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTILVA, M.J.; ROMERO, M.P. The Effect of the Ripening Process of the Olive Fruit on the Chlorophyll and Carotenoid Fractions of Drupes and Virgin Oils. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Ed. Elsevier, Capítulo 7, p. 59-68, 2010.

MULINACCI, N.; LERI, F.; IGNESTI, G.; ROMANI, A.; CRETI, D.; INNOCENTI, M.; CALAMAI, L. The freezing process helps to preserve the quality of extra virgin olive oil over time: A case study up to 18 months. *Food Research International*, v.54, p. 2008-2015, 2013.

NCI/ NIH - *National Cancer Institute at the National Institutes of Health*, 2009. Disponível em: < <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/handlingprep.html> > Acesso em: 09/2013.

NEDEVA, T.S.; PETROVA, V.Y.; ZAMFIROVA, D.R.; STEPHANOVA, E.V. KUJUMDZIEVA, A.V. Cu/Zn superoxide dismutase in yeast mitochondria; a general phenomenon. *FEBS Letters*, v.203, p.19–25, 2004.

NICHOLLS, P. Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 525 , p.95–101, 2012.

NISHIKAWA, M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Letters*, v. 266, p. 53–59, 2008.

OCAKOGLU, D.; TOKATLI, F.; OZEN, B.; KOREL, F. Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, v. 113, p.410-410, 2009.

OBINGER, C. Catalases and hydrogen peroxide metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.525, 93–9, 2012.

OLIVEIRA, A.F.; NETO, J. V.; GONÇALVES, E.D.; VILLA, F.; SILVA, L.F.O. Parâmetros físico-químicos dos primeiros azeites de oliva brasileiros extraídos em Maria da Fé Minas Gerais. *Scientia Agraria*, v.11, p. 255-261, 2010.

OLIVEIRA, M. C.; RAMOS, J. D.; PIO, R.; CARDOSO, M. G. Características fenológicas e físicas e perfil de ácidos graxos em oliveiras no sul de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, p. 30-35, 2012.

OMAR, S. H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, v. 78, p.133–154, 2010.

OROZCO-SOLANO, M.I.; FERREIRO-VERA, C.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Automated method for determination of olive oil phenols and metabolites in human plasma and application in intervention studies. *Journal of Chromatography A*, v. 1258, p.108– 116, 2012.

OU, B., HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 50, p.3122-3128, 2002.

OWEN, R. W.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, p. 647-659, 2000.

OWEN, S.C.; DOAK, A.K.; WASSAM, P.; SHOICHET, M.S.; BRIAN, K. Colloidal aggregation affects the efficacy of anticancer drugs in cell culture. *ACS Chem. Biol.*, v.7, p. 1429–1435, 2012.

PAREEK, A.; GODAVARTHI, A.; ISSARANI, R.; NAGORI, B. P.; Antioxidant and hepatoprotective activity of *Fagonia schweinfurthii* (Hadidi) Hadidi extractin carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in HepG2 cell line and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.150, p.973–981, 2013.

PATEL, K. K.; STAPPENBECK, T. S. Autophagy and intestinal homeostasis. *Annual Review of Physiology*, v. 75, p.241-262, 2013.

PAULING, L. SHEEHAN, JR. The dissociation energy of carbon monoxide and the heat of sublimation of graphite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 35, n. 7, p. 229–232, USA, 1949.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNEIRO, M.; DÍAZ- RUBIO, M.E.; SERRANO, J. GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, mensurement and expression of results. *Food Research International*, v. 41, p. 274-285, 2008.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R.; FERNÁNDEZ-ALONSO, A. M.; CHEDRAUI, P.; SIMONCIN, T. Bioactive Food as Dietary Interventions for the Aging Population: *Mediterranean Lifestyle and Diet*: Deconstructing Mechanisms of Health Benefits. Chapter 10. Ed. Elsevier, 2013.

PERONA, J. S.; CABELLO-MORUNO, R.; RUIZ-GUTIERREZ, V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.17, p.429-445, 2006.

PERRY, J. J. P.; SHIN, D. S; GETZOFF, E. D.; TAINER, J. A. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1804, p. 245-262, 2010.

POMARICI, E.; VECCHIO,R. The Italian olive oil industry in the global competitive scenario. *Agricultural Economics Journals*, v. 59, n. 8, p. 361-372, 2013.

PORIM. Carotene content: Methods of test for palm oil and palm oil products. In: PORIM methods, *Palm Oil Research Institute of Malaysia*, p. 43-44, 1995.

POULIAREKOU, E.; BADEKA, A.; TASIOULA-MARGARI, M.; KONTAKOS, S.; LONGOBARDI,F.; KONTOMINAS, M.G. Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 7534-7542, 2011.

POWER, O., JAKEMAN, P., & FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: Enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, v.44, n.3, p.797-820, 2013.

PREVC, T.; ŠEGATIN, N.; ULRIH, N. P.; CIGIĆ, B. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, v. 09, p.13-19, 2013.

PRIORE, P.; SICULELLA, L.; GNONI, G.V. Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 25, p. 683-691, 2014.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Quality of extra virgin olive oils produced in an emerging olive growing area in north-western Spain. *Food Chemistry*, v. 164, p. 418-426, 2014.

RIBEIRO-DIAS, F.; BARBUTO, J. M.; TSUJITA, M.; JANCAR, S. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE and EDTA. *Journal of Immunological Methods*, v. 241, p.121-129, 2000.

RIBEIRO, T. P.; FERNANDES, C.; MELO, K.V.; FERREIRA, S.S.; LESSA, J. A.; FRANCO, R.W.A.; SCHENK, G.; PEREIRA, M. D.; HORN JR., A. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, v.80, p. 67–76, 2015.

ROCA, M., MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. Involvement of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olive varieties with high and low concentration of chlorophyll. *Physiologia Plantarum*, v. 117, p. 459-466, 2003.

RODRIGUEZ-RAMIRO, I.; MARTÍN, M. Á.; RAMOS, S.; BRAVO, L.; GOYA, L. Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicology*, v. 288, p. 43– 48, 2011.

RONDANINI, D. P.; CASTRO, D .N.; SEARLES, P. S.; ROUSSEAU, M. C. Contrasting patterns of fatty acid composition and oil accumulation during fruit growth in several olive varieties and locations in a non-Mediterranean region. *European Journal Agronomy*, v. 52, p. 237–246, 2014.

ROSIGNOLI, P.; FUCCELLI, R.; FABIANI, R.; SERVILI, M.; MOROZZIA, G. Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.24, p.1513–1519, 2013.

RUIZ-CANELA, M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A. Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, v. 68, p.245–250, 2011.

SAMANIEGO-SÁNCHEZ, C.; QUESADA-GRANADOS, J.J.; DE LA SERRANA, H. LG.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M.C. β -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.23, p. 671–676, 2010.

SÁNCHEZ, C. S.; GONZÁLEZ, A. M. T.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; GRANADOS, J.J.Q.; GARCÍA DE LA SERRANA, H.L.; MARTÍNEZ, M.C.L. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, v. 593, p.103–107, 2007.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; CÁRDENO, A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; APARICIO-SOTO, M.; DE LA LASTRA, C.A. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, p.1401–1413, 2013.

SARRIA, B. MATEOS, R.; GALLARDO, E.; RAMOS, S.; ÁNGELES, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Nitroderivatives of olive oil phenols protect HepG2 cells against oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 3752–3758, 2012.

SCHEIDEL, A.; KRAUSMANN, F. Diet, trade and land use: a socio-ecological analysis of the transformation of the olive oil system. *Land Use Policy*, v. 28, p. 47–56, 2011.

SCODITTI, E.; CAPURSO, C.; CAPURSO, A.; MASSARO, M. Vascular effects of the Mediterranean diet - Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascular Pharmacology*, v. 63, p. 127–134, 2014.

SILVA, S. M.; SAMPAIO, K. A.; TAHAM, T.; ROCCO, S. A.; CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A. Characterization of oil extracted from buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian Amazon region. *Journal of American Oil Chemist Society*; v. 86, p. 611–616, 2009.

SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry* 178, p. 52–62, 2015.

SEGURA-CARRETERO, A.; MENÉNDEZ-MENÉNDEZ, J.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Polyphenols in Olive Oil: The importance of phenolic compounds in the chemical composition of olive oil. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Ed. Hardbound, ap. 19, p. 171, 2010.

SPENCER, J.P.E.; EL MOHSEN, M. M. A.; RICE-EVANS, C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 423, p. 148–161, 2004.

TAN, J.B.L.; LIM, Y.Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chemistry*, v. 172, p. 814–822, 2015.

TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 43, p. 4–15, 2007.

TSAI, J.Y.; LEE, M. J.; DAH-TSYR, M.; HUANG, H. The effect of catalase on migration and invasion of lung cancer cells by regulating the activities of cathepsin S, L, and K. *Experimental Cell Research* v. 32, n. 3, p. 28–40, 2014.

TURRENS, J.F. Superoxide Dismutase and Catalase. Ed. Elsevier, 2010.

TURRENS, J.F. Superoxide Dismutase and Catalase. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 2014.

URIBE, E.; LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GALVEZ, A.; ZAMORANO, M. QUISPE-FUENTES, I. PASTEN, A.; DI SCALA, K. Influence of process temperature on drying kinetics, physicochemical properties and antioxidant capacity of the olive-waste cake. *Food Chemistry*, v. 147, p. 170–176, 2014.

VALDAMERI, G.; TROMBETTA-LIMA, M.; WORFEL, P.R.; PIRES, A.R.; MARTINEZ, G.R.; NOLETO, G.R.; CADENA, S.M.; SOGAYAR,

M.C.; WINNISCHOFER, S.M.; ROCHA, M.E. Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 193, p. 180–189, 2011.

VASILESCU, I.; EREMIA, S.A.V; ALBU, C.; RADOI, A.; LITESCU, SC.; RADU, G.L. Determination of the antiradical properties of olive oils using an electrochemical method based on DPPH radical. *Food Chemistry* 166, p.324–329, 2015.

VICHIA, S. CORTÉS-FRANCISCO, N.; CAIXACH, J. Insight into virgin olive oil secoiridoids characterization by high-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements. *Journal of Chromatography A*, v.1301, p.48- 59, 2013.

VIOLANTE, G; ZERROUK, N; RICHARD, I; PROVOT, G; CHAUMEIL, JC; ARNAUD, P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon tumor cell cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.25, n. 12, p.1600-1603, 2002.

VIRRUSO, C.; ACCARDI, G.; COLONNA-ROMANO, G.; CANDORE, G.; VASTO, S.; CARUSO, C. Nutraceutical properties of extra-virgin olive oil: a natural remedy for age-related disease? *Rejuvenation Research*, v.17, n. 2, p. 217-220, 2014.

WU, Y.H., ZHANG, X.M., HU, M.H., WU, X.M., ZHAO, Y. Effect of *Laggeraalata* on hepatocytes damage induced by carbontetrachloride *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.126, p. 50 –56, 2009.

XU, J.; MA, C.; HAN, L.; GAO, H.; ZHOU, Q.; YANG, M.; CHEN, C.; DENG, Q.; HUANG Q, HUANG, F. Optimized rapeseed oils rich in endogenous micronutrients ameliorate risk factors of atherosclerosis in high fat diet fed rats. *Lipids Health Disease*, v.13, n.1, p. 166, 2014.

ZHAO, J. T.; MA, D. H.; LUO, M.; WANG, W.; ZHAO, C. J.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; WINK, M. *In vitro* antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Food Research International*, v.56, p. 243–251, 2014.