

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Perfil metabolômico de folhas de cultivares de oliveiras nas diferentes
estações do ano**

Alexandre Lorini

Pelotas, 2018

Alexandre Lorini

**Perfil metabolômico de folhas de cultivares de oliveiras nas diferentes
estações do ano**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Rui Carlos Zambiasi

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L872p Lorini, Alexandre

Perfil metabolômico de folhas de cultivares de oliveiras nas diferentes estações do ano / Alexandre Lorini ; Rui Carlos Zambiasi, orientador. — Pelotas, 2018.
85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Atividade antioxidante. 2. Compostos bioativos. 3. Perfil metabólico. 4. *Olea europaea* L.. I. Zambiasi, Rui Carlos, orient. II. Título.

CDD : 664

Alexandre Lorini

Perfil metabolômico de folhas de cultivares de oliveiras nas diferentes estações do ano

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de fevereiro de 2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi (Orientador). Doutor em Ciência de Alimentos e Nutrição pela Universidade de Manitoba.

Profa. Dra. Andressa Carolina Jacques. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Profa. Dra. Carla Rosane Barboza Mendonça. Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dra. Deborah Murowaniecki Otero. Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe, Ilzamar Teresa Durante, por nunca ter medido esforços para me ajudar na caminhada da Pós-Graduação, sempre me incentivando a buscar meus sonhos e não desistir. Agradeço por toda educação e princípios morais e éticos que me passou, eles iniciaram a construção do meu caráter. Foi, além de mãe, pai, tio, tia, avô e avó, foi minha família inteira e continua sendo toda a família que eu tenho.

Agradeço ao meu orientador, pela agilidade nos momentos necessários, pelas viagens a Pinheiro Machado, e pelo auxílio na coleta das folhas, os risos foram maiores que o trabalho.

As professoras convidadas para participar da banca, Andressa C. Jacques e Carla R. B. Mendonça, e a pós-doutoranda Deborah M. Otero, por terem aceitado e por agregarem valor a minha pesquisa.

A amiga Thayli Ramires Araújo, por se fazer presente em toda minha jornada em Pelotas, pelas inúmeras viagens para Jaguarão, por dividir sua família comigo nos momentos em que eu mais precisei, por me tornar dindo da Aurora, pelas conversas, pelos dramas, pelas festas, enfim, por estar sempre me apoiando e me dando um ombro amigo.

As minhas amigas do Mato Grosso, que sempre que eu volto estão de braços abertos para me receber e colocar em dia todos os nossos sonhos, desejos, medos, frustrações, segredos, enfim, meu muito obrigado a vocês, Aurélia E. O. Piaia, Biana F. V. Costa e Thaís R. Rodrigues.

Ao meu melhor amigo, Bruno L. Mendes, por se fazer presente, sempre me dando conselhos e sua ajuda nos momentos difíceis, apesar da distância entre a gente.

A todos os amigos que fiz durante o mestrado, no laboratório, no departamento, em Pelotas: José M. A. S. Júnior, Michele M. Crizel-Cardoso, Fernanda D. Krumreich, Fernanda M. Oliveira, Bruna F. Antunes, Bruna W. Bohmer, Cristina Jansen, Ester S. S. Saldanha, Raquel M. Oliveira, Marcela V. Garcia, Itiane B. Jaskulski, Elisa S. Pereira, Thamara B. Vitalino, Gabriela M. Soares.

A Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial, a todo seu corpo de docentes, que possibilitaram minha estada nesta instituição durante o período do meu mestrado.

As agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

Encerrando, a todos aqueles que de alguma forma passaram pela minha vida e deixaram comigo um pedaço de si. Muito obrigado!!

Resumo

LORINI, Alexandre. **Perfil metabólico de folhas de cultivares de oliveiras nas diferentes estações do ano**. 2018. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Considerada uma cultura milenar, a oliveira (*Olea europaea* L.) possui além de seu fruto, as folhas, que contêm quantidades apreciáveis de compostos bioativos, os quais estão relacionados com o sistema de defesa das plantas e com diversas ações no organismo humano. Os estresses abióticos funcionam como mecanismos de ativação das rotas de síntese destes compostos, devido ao aumento do nível oxidativo nas plantas pela produção de radicais livres. Comumente cultivada na região do mediterrâneo, diversos programas de melhoramento foram responsáveis pela modificação e criação de novas cultivares de oliveira, para que estas pudessem ser cultivadas em toda a parte do mundo. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil metabólico de folhas de cultivares de oliveira (Arbequina, Manzanilla e Picual) coletadas em nas diferentes estações do ano (outono, inverno, primavera e verão) em Pinheiro Machado/RS durante 2016/17. Foram realizadas por espectrofotometria a determinação de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, carotenoides e clorofilas, enquanto que a identificação e quantificação de fenólicos individuais, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. Também foram realizados ensaios de potencial antioxidante pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS. Como resultados foi possível observar que as folhas da cultivar Manzanilla apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e que as folhas coletadas no verão apresentaram uma quantidade desses compostos significativamente maior que as coletadas nas outras estações. Consequentemente, os potenciais antioxidantes dos extratos polares destas folhas apresentaram alta correlação com estes compostos, sendo observado maiores potenciais nos mesmos tratamentos em que o conteúdo de compostos fenólicos se sobressaiu. Compostos polares e apolares se comportaram de maneira diferente, gerando questionamentos sobre como as vias de síntese destes compostos interagem ou se são independentes. A relação entre a finalidade da cultivar (produção de azeite ou azeitonas de mesa) e os compostos bioativos nas folhas ainda precisa ser melhor estudada, devido aos maiores níveis de compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis encontrados na Manzanilla neste trabalho. Por fim, foi possível concluir que a cultivar e a época de coleta possuem relação significativa com o perfil metabólico de folhas de oliveira.

Palavras-chave: atividade antioxidante, compostos bioativos, perfil metabólico, *Olea europaea* L.

Abstract

LORINI, Alexandre. **Metabolomic profile of olive cultivars leaves in the different seasons of the year**. 2018. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Considered a millenary culture, the olive tree (*Olea europaea* L.) has besides its fruit, the leaves, which contain appreciable amounts of bioactive compounds, which are related to the system of defense of plants and with various actions in the human organism. The abiotic stresses act as mechanisms of activation of the routes of synthesis of these compounds, due to the increase of the oxidative level in the plants by the production of free radicals. Commonly cultivated in the Mediterranean region, several breeding programs were responsible for the modification and creation of new olive cultivars, so that they could be cultivated throughout the world. Therefore, the objective of this study was to evaluate the metabolic profile of leaves of olive cultivars (Arbequina, Manzanilla and Picual) collected in the different seasons of the year (autumn, winter, spring and summer) in Pinheiro Machado / RS during 2016/17. The determination of phenolic compounds, flavonoids, tannins, carotenoids and chlorophylls were performed by spectrophotometry, while the identification and quantification of individual phenolics was performed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Antioxidant potential tests were also carried out using DPPH, FRAP and ABTS methods. As results it was possible to observe that the leaves of the cultivar Manzanilla presented the highest contents of phenolic compounds and that the leaves collected in the summer presented a quantity of these compounds significantly higher than those collected in the other seasons. Consequently, the potential antioxidants of the polar extracts of these leaves showed high correlation with these compounds, being observed greater potentials in the same treatments in which the content of phenolic compounds excelled. Polar and nonpolar compounds behaved differently, raising questions about how the synthesis pathways of these compounds interact or whether they are independent. The relationship between the purpose of the cultivar (oil production or table olives) and the bioactive compounds in leaves still needs to be better studied, due to the higher levels of phenolic compounds and hydrolysable tannins found in Manzanilla in this work. Finally, it was possible to conclude that the cultivar and the collection season have a significant relationship with the metabolic profile of olive leaves.

Key-words: antioxidant activity, bioactive compounds, metabolic profile, *Olea europaea* L.

Sumário

1	Introdução.....	9
1.1.	História e evolução da oliveira	11
1.2.	Características botânicas e condições de cultivo	13
1.3.	Composição bioativa de folhas de oliveira.....	16
1.4.	Propriedades biológicas das folhas de oliveira	18
1.5.	Aplicação das folhas em produtos alimentícios	19
1.6.	A era da metabolômica.....	20
1.7.	Metabolismo secundário em plantas	22
2	Capítulo 1 – Artigo de revisão.....	24
3	Capítulo 2 – Pesquisa de bancada	45
4	Considerações finais.....	65
5	Referências bibliográficas.....	66
6	Apêndice.....	82

1 Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore frutífera da família botânica Oleaceae, característica do Mediterrâneo; contudo, é encontrada em muitas regiões do globo terrestre. Os dois principais produtos oriundos desta planta são o azeite e as azeitonas de mesa, sendo estimado uma produção mundial em 2017 de aproximadamente 2,95 milhões de toneladas de azeitonas e 2,89 milhões de toneladas de azeite (IOC, 2018). Além do fruto, as folhas da oliveira também podem ser utilizadas como um coproduto, o qual fornece componentes considerados essenciais para a saúde humana, principalmente devido a presença de compostos bioativos como os compostos fenólicos (Govaris et al., 2010; Kiritsakis et al., 2010; Herrero et al., 2011).

Os principais compostos identificados nas folhas de oliveira são da classe dos fenólicos simples, flavonoides e secoiridoides (Talhaoui et al., 2015). Todos estes compostos são originários do metabolismo especializado da planta e possuem função protetiva para a oliveira e para outras plantas em que são sintetizados. Além disso, alguns autores já observaram atividades anti-hipertensiva (Obied et al., 2012), anticancerígena (Bouallagui et al., 2011; Barrajón-Castalán et al., 2015), anti-inflamatória (Lockyer et al., 2015), antimicrobiana (Pereira et al., 2007), hipocolesterolêmicas (Wang et al., 2008), imunomoduladoras no sistema gastrointestinal, respiratório e nervoso central, quimiopreventiva, cardiovascular e até para distúrbios metabólicos (Cumaoglu et al., 2011; Obied et al., 2012; Bulotta et al., 2014;).

As características dos extratos das folhas de oliveira despertam crescente interesse devido aos antioxidantes naturais presentes serem econômicos e eficientes, os quais podem prolongar o tempo de validade dos produtos alimentares, evitando perdas em suas qualidades sensoriais (Bouaziz et al., 2010; Erbay e Icier, 2010). Além da incorporação dos extratos em alimentos, eles podem também ser utilizados como nutracêuticos e/ou aproveitados pela indústria farmacêutica para fabricação de remédios através da extração de seus compostos.

Os estresses abióticos que as plantas são submetidas, como falta ou excesso de água, extremos de frio ou calor, incidência de luz ultravioleta B (UV-

B), poluentes do ar, ferimentos mecânicos e a deficiência nutricional, produzem radicais livres e por consequência provocam estresses oxidativos (Le Gall et al., 2015). Autores perceberam que em oliveiras o déficit hídrico é um fator importante para a produção de compostos fenólicos e de flavonoides, os quais têm a função de regular o balanço de radicais livres no organismo da planta e evitar a sua morte (Nakabayashi e Saito, 2015). Alguns autores observaram o aumento de compostos fenólicos, dentre eles da oleuropeína e de hidroxitirosol, e consequentemente o aumento da capacidade antioxidante de folhas quando submetidas a algum tipo de estresse (Sofo et al., 2004; Arslan et al., 2013; e Doupis et al., 2013).

Estes vários metabólitos presentes nas plantas são uma fonte de estudo para o ramo da metabolômica, e vêm se tornando uma ferramenta muito importante em diversas áreas na ciência de alimentos, como a conformidade de regulamentos, processamento, qualidade, segurança e microbiologia (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Muitos trabalhos já foram realizados com técnicas metabolômicas, e nem sempre eles apresentam a mesma finalidade (Zorb et al., 2006; Wahyuni et al., 2013; Aranha, 2016; Hoffmann, 2016).

As folhas de oliveira são um coproduto de grande interesse pela indústria farmacêutica e de alimentos, por serem ricas em compostos com atividade biológica. Sabe-se que os estresses pelos quais as plantas passam resultam em respostas no seu metabolismo e que as oliveiras não são plantas nativas da região sul do Rio Grande do Sul. Portanto, percebe-se a importância em avaliar a influência das variações na temperatura durante as mudanças das estações do ano na região do Pampa Gaúcho no perfil metabólico das folhas de oliveiras, que resultam na produção de diferentes compostos do metabolismo especializado, assim como variações em suas quantidades.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil metabolômico das folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) de diferentes cultivares (Arbequina, Manzanilla e Picual) durante as mudanças de estação do ano no Pampa gaúcho, visando encontrar a melhor cultivar e época do ano para a coleta das folhas.

1.1. História e evolução da oliveira

Aproximadamente há 6000 anos a oliveira começou a ser cultivada na bacia do mediterrâneo, e acredita-se que o cultivo dela começou antes que a palavra fosse inventada. Arqueólogos indicam que o cultivo começou originalmente na Síria, Israel, Líbano, Chipre e Creta. De Creta, onde foi se espalhando para o resto da Grécia, e por volta de 600 antes de Cristo (aC) esta cultura foi introduzida na Itália e no norte da África (Kostelenos e Kiritsakis, 2017).

De Roma o cultivo da oliveira se expandiu por todo o Império Romano, além de ser introduzida na Espanha com a ajuda de gregos e árabes. Depois da cultura estar instalada na Itália e Espanha, o cultivo foi amplamente difundido pelo sul da Europa, e, portanto, daí vem o nome *Olea europaea*. Com a descoberta do continente norte-americano, a oliveira foi levada por colonos espanhóis e plantadas pela primeira vez por volta de 1800 depois de Cristo (dC) na Califórnia (Kostelenos e Kiritsakis, 2017).

Contudo, alguns pesquisadores acreditam que a oliveira não seja originária da bacia do mediterrâneo, mas das margens ocidentais do Mar Cáspio, do Cáucaso do Sul, Sudão e Etiópia (Breton et al., 2012). Estas suposições se devem a um grande número de oliveiras selvagens nestas regiões. Estudos moleculares realizados pelos autores concluíram que as oliveiras presentes na região são descendentes da oliveira selvagem. No entanto, a origem e domesticação da oliveira, de forma geral, permanecem desconhecidas.

Segundo Hadji Savvas (2008) a domesticação da oliveira pode ter iniciado no mediterrâneo oriental com a utilização da madeira como combustível ou na construção e das folhas para a alimentação animal, além do processamento de azeite de oliva, para uso medicinal, cosmético e combustível para lâmpadas. Além disso, o autor também relata que, assim como outras árvores frutíferas, a domesticação da oliveira pode ser relacionada ao fato de possuir frutos comestíveis.

No Brasil, segundo Coutinho et al. (2009), a oliveira foi introduzida há vários séculos em quase todos os estados. No ano de 1948 a cultura foi introduzida oficialmente no estado do Rio Grande do Sul após a criação de um

órgão especializado em serviços oleícolas na Secretaria de Agricultura. Contudo os plantios ainda eram pouco desenvolvidos, devido a forma como foi incentivado o desenvolvimento da cultura. Somente depois de análises em laboratórios comprovarem que as azeitonas e o azeite produzido no Brasil possuíam a mesma qualidade dos italianos é que realmente o plantio foi intensificado (Coutinho et al., 2009).

No ano de 2005, um projeto da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Clima Temperado foi iniciado com o intuito de fornecer suporte técnico aos olivais já implantados e aos futuros, junto com o melhoramento dos frutos (Bertoncini et al., 2010).



Figura 1. Produção de azeitonas pelas regiões do mundo em 2017. Fonte: (IOC, 2018)

Atualmente, cerca de 30 países ao redor do mundo cultivam oliveiras, contudo é na bacia mediterrânea que está localizada o maior número dessa cultura, sendo a principal fonte de produção azeite de oliva do mundo. Esta produção mundial só foi possível devido a estudos que produziram mais de 1500 cultivares de oliveira, para se adequar aos mais diferentes ambientes e climas. Estima-se que o cultivo de oliveira ocupe mais de 9,8 milhões de hectares, sendo

a 6ª cultura mais importante para a produção de óleos comestíveis (Kostelenos e Kiritsakis, 2017).

Segundo dados da International Olive Council (IOC, 2018), em 2017 foi produzido aproximadamente 2,95 milhões de toneladas de azeitonas no mundo (Figura 1), e processados 2,89 milhões de toneladas de azeite de oliva.

1.2. Características botânicas e condições de cultivo

A taxonomia clássica da planta de oliveira por categoria, nome científico e nome comum estão apresentados a seguir (USDA, 2018):

- . Reino: Plantae - plantas;
- . Subreino: Tracheobionta - plantas vasculares;
- . Superdivisão: Spermatophyta - plantas de semente;
- . Divisão: Magnoliophyta - plantas com flores;
- . Classe: Magnoliopsida - dicotiledôneas;
- . Subclasse: Asteridae;
- . Ordem: Scrophulariales;
- . Família: Oleaceae - família oliveira;
- . Gênero: *Olea* L. - Oliva;
- . Espécie: *Olea europaea* L. - Oliva;
- . Subespécie: *Olea europaea* L. ssp. *europaea* - azeitona europeia.

Além disso, a espécie *O. europaea* possui seis subespécies: subespécie *cuspidata*, derivada do sul e leste da África e se espalha do Oriente Médio para China; subsp. *laperrinei*, derivada do centro-sul do Saara e do Sahel oriental; subsp. *maroccana*, advinda do sudoeste de Marrocos, a oeste do Monte Atlas; subsp. *cerasiformis*, proveniente das Ilhas Canárias e da Madeira, e Porto Santo; subsp. *guanchica*, derivada das ilhas Canárias; e a subsp. *Europaea*, que é subdividida em duas variedades, a silvestre e a cultivada na Europa (Kostelenos e Kiritsakis, 2017).

Ao longo dos anos, muitas cultivares de azeitonas foram desenvolvidas para se adequar as condições de cultivo, sendo que as quatro principais

cultivares para produção de azeite são: Koroneike na Grécia, Frantoio na Itália, Arbequina na Espanha e Mission nos Estados Unidos da América (Kostelenos e Kiritsakis, 2017). Porém, atualmente existem muitas outras cultivares, sendo algumas delas próprias para produção de azeitonas de mesa. As azeitonas diferenciam-se em vários aspectos, como cor, tamanho e o teor e qualidade de óleo, revelando um metabolismo próprio para cada cultivar.

Existe uma grande gama de cultivares, com características próprias e resistência a estresses que permitem o plantio da oliveira em vários locais do planeta. No estado do Rio Grande do Sul várias cultivares podem ser cultivadas, entre elas a Arbequina, Manzanilla e Picual (Cappellaro et al., 2009). A seguir estão apresentadas algumas informações pertinentes a cada uma delas:

Arbequina: É uma cultivar espanhola, muito apreciada pela alta produtividade, tamanho médio de fruto (Figura 2a), alto rendimento de óleo e cultivo fácil para pomares. Os óleos são ricos em polifenóis, com amargor médio e alto sabor de pungência, embora se destaque o alto índice de estabilidade e alto teor de ácido oleico. É adequada para misturar com óleos de baixa estabilidade (Tous, 2017).

Picual: É uma cultivar importante na Catalunha, também encontrada em vários lugares do mundo. Resistente a geadas e adaptável a diferentes condições climáticas e de solo. Seus frutos (Figura 2b) amadurecem no início e no meio da temporada. Possui alto teor de óleo, sendo produzido um azeite com sabor frutado médio, equilibrado na boca e facilmente apreciado pelos novos consumidores devido ao seu sabor adocicado, contudo apresenta baixa estabilidade (Tous, 2017).

Manzanilla: Também de origem espanhola, sendo a mais apreciada e difundida devido à alta produtividade e qualidade dos frutos (Figura 3) para azeitona de mesa. Apresenta porte reduzido e se adapta ao cultivo intensivo. É susceptível ao frio e a separação entre polpa e caroço é realizada facilmente (Cappellaro et al., 2009).



(a)



(b)

Figura 2. Azeitonas das cultivares Arbequina (a) e Picual (b). Fonte: (Tous, 2017)



Figura 3. Azeitonas da cultivar Manzanilla. Fonte: (Cappellaro et al., 2009)

A oliveira é uma árvore com formato arredondado com tempo de vida de mais de 1000 anos, podendo medir entre 15 e 20 metros, e quando mantida sob práticas agrícolas, pode ser reduzida a alturas de 4 a 5 m (Tsantili et al., 2017). Quanto ao fruto, a azeitona, pode ser dividido em três parte: epicarpo (pele) que representa 1-3% do peso; o mesocarpo, porção comestível que representa 70-80% do fruto; e o endocarpo, que representa a semente e o peso restante do fruto (Farinelli et al., 2002). Segundo Tsantili et al. (2017) o tamanho e a forma do fruto podem variar com a cultivar, carga de frutos, fertilidade do solo, água presente no solo e práticas agrícolas, sendo as cultivares com tamanho de frutos grandes destinadas a processamento de azeitonas para mesa, enquanto que aquelas com tamanho de fruto pequeno são destinados para produção de azeite de oliva.

Por ser uma cultura de clima subtropical, a oliveira deve ser cultivada nas zonas temperadas e subtropicais, sob variações climáticas e de solo. As plantas necessitam de invernos suaves e verões quentes e secos, com temperatura anual média de 15-20°C. Geadas na primavera e antes da colheita não são fatores benéficos, podendo provocar o murchamento das azeitonas, queima das folhas e até a necrose da árvore. As cultivares mais resistentes à geadas são: a Cornicabra, Arbequina, Picual, Mission, Leccino, Carolea, Chemlali, Moraiolo e Picholine (Barranco et al., 2005). Nas regiões tropicais não é viável o cultivo da oliveira, devido a falta de baixas temperaturas necessárias para a floração, contudo, algumas cultivares poderiam ser cultivadas em clima tropical, contanto que em elevada altitude, para atender as necessidades de baixa temperatura (Tsantili et al., 2017).

Em estudo realizado por Tous et al. (2014) foi concluído que 70% das plantações de oliveira no mundo são tradicionais, sendo a densidade de árvores é de 120 por hectare; 29% são pomares modernos, ou intensivos, com 200 a 400 árvores por hectare ou de alta densidade com 450 a 800 árvores/ha; e somente 1% são pomares com super-alta densidade, com mais de 1500 árvores/ha.

Em relação as folhas, Fernández-Escobar et al. (2012) relatam que elas se apresentam em formas de penas, cobertas por uma camada de cera e cutícula. Além disso, seus estômatos estão quase deitados na superfície inferior, protegendo as folhas da perda de água e da radiação UV, podendo aumentar em até três vezes a superfície eficiente da folha.

1.3. Composição bioativa de folhas de oliveira

A composição bioativa das folhas de oliveira apresenta variações conforme a variedade, cultivar, região de cultivo, solo, condições climáticas, entre outras. Os compostos presentes nas folhas de oliveira a tornam um material complexo (Tabela 1), que inclui flavonoides e seus derivados glicosilados, secoiridoides e seus derivados, fenois simples, ácidos fenólicos e derivados, dentre outros.

Tabela 1. Classes de compostos bioativos presentes em folhas de oliveira

Família de compostos	Compostos	Referência
Flavonoides	Catequina, rutina, luteolina, taxifolina, diosmina, diosmetina, cirstimaritin, apigenina, quercetina, eriodictiol, luteolina-7-glicosídeo, apigenina-7-glicosídeo, luteolina diglicosídeo, luteolina-7-rutinosídeo, apigenina-7-rutinosídeo	Meirinhos et al. (2005), Silva et al. (2006), Japón-Luján e De Castro (2008), Mylonaki et al. (2008), Kiritsakis et al. (2010), Taamalli et al. (2012a, 2012b), Quirantes-Piné et al. (2013), Talhaoui et al. (2014)
Fenóis simples	Hidroxitirosol, tirosol, hidroxitirosol hexosídeo, hidroxitirosol acetato, tirosol glicosídeo, vanilina	Silva et al. (2006), Japón-Luján e De Castro (2008), Kiritsakis et al. (2010), Quirantes-Piné et al. (2013), Talhaoui et al. (2014)
Ácidos fenólicos e derivados	Ácido cafeico, ácido vanílico, ácido homovanílico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido clorogênico, ácido caftárico, ácido quínico	Quirantes-Piné et al. (2013)
Secoiridoides e seus derivados	Secologanosídeo, oleosídeo, oleuropeína, siringaresinol, lucidomosídeo D, dimetiloleuropeína, oleuropeína aglicona, oleosídeo metil éster, oleuropeína diglicosídeo, hidroxí oleuropeína, ligstrosídeo, ácido elenólico	Silva et al. (2006), Japón-Luján e De Castro (2008), Kiritsakis et al. (2010), Quirantes-Piné et al. (2013), Talhaoui et al. (2014)

Adaptado de Rodríguez-Pérez et al. (2017)

Segundo pesquisadores que avaliaram a composição bioativa de folhas de oliveira da região do Pampa Gaúcho, elas apresentam médias de 16,1 a 30,2 mg.g⁻¹ de ácido gálico, 33,1 mg.100g⁻¹, 13 mg.100g⁻¹ e 46,1 mg.100g⁻¹ de clorofilas “a”, “b” e totais. Os teores de carotenoides expressos em luteína, zeaxantina e β-caroteno foram de, 26,12 mg.100g⁻¹, 22,95 mg.100g⁻¹ e 10,76 mg.100g⁻¹ respectivamente. Foram observados teores de tocoferóis totais de 10,42 mg.100g⁻¹, sendo 8,88 mg.100g⁻¹ de α-tocoferol, 0,83 mg.100g⁻¹ de γ-tocoferol, 0,71 de δ-tocoferol e 0,02 de β-tocoferol (Pacetta, 2007; Cavalheiro et al., 2014; Machado et al. 2014).

Romero et al. (2017) quando avaliaram folhas de oliveira cultivada sob condições agronômicas comuns perceberam que podem ser encontrados teores de 20 e 70 g.kg⁻¹ para ácidos triterpênicos e compostos fenólicos. Guinda et al. (2015) avaliou quatro cultivares espanholas (Picual, Hojiblanca, Arbequina e

Lechin) e observou teores que variaram de 8,02 a 15,8 % de compostos fenólicos em peso de folha seca.

Em relação a quantidade de compostos fenólicos quantificados nas folhas de oliveira, estudo realizado por Romero et al. (2017) encontrou teores de oleuropeína que variaram para a cultivar Picual de 47468 a 72117 mg.kg⁻¹ e Arbequina 30456 a 55577 mg.kg⁻¹ entre três períodos de coleta (novembro/janeiro/abril). Quando quantificado os compostos fenólicos individuais em cultivares espanholas, Guinda et al. (2015) encontraram teores variando de: 0,53 a 1,12 % para hidroxitirosol, 4,46 a 8,72 % para oleuropeína, 0,40 a 0,78 % para verbascoside.

1.4. Propriedades biológicas das folhas de oliveira

Durante o império egípcio os extratos das folhas de oliveira eram muito conhecidos e utilizados devido as suas propriedades medicinais e na preservação de alimentos (Rahmanian et al., 2015). No início de 1900, quando haviam vários surtos de malária, o chá das folhas de oliveira também era utilizado, e apresentava resultados superiores ao quinino no tratamento da doença (Therios, 2009).

Além de serem conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, farmacologicamente, os extratos das folhas de oliveira vêm sendo utilizados como anti-hipertensivo (Obied et al., 2012), anticancerígeno (Bouallagui et al., 2011; Barraón-Castalán et al., 2015), anti-inflamatório (Lockyer et al., 2015), antimicrobiano (Pereira et al., 2007), hipocolesterolêmicos (Wang et al., 2008), imunomodulador no sistema gastrointestinal, respiratório e nervoso central, quimiopreventivo, cardiovascular e até para distúrbios metabólicos (Cumaoglu et al., 2011; Obied et al., 2012; Bulotta et al., 2014;).

Extratos de folhas de oliveira inferiram na redução da pressão sanguínea e da glicemia, e no aumento do fluxo sanguíneo, relaxando as artérias (Kono et al., 2013). Foi observado que os compostos fenólicos presentes na folha, como a oleuropeína, seus derivados e hidroxitirosol, tem efeitos hipocolesterolêmico devido a diminuição do colesterol total sérico, na redução de triglicerídeos e dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), assim como na redução do

processo de peroxidação lipídica e no aumento da atividade enzimática antioxidante (Jemai et al., 2008a; 2008b).

O extrato das folhas de oliveira demonstrou também alta atividade anticâncer, sendo observado sua atividade contra duas linhas tumorais da tireoide (Bulotta et al., 2013), de tumores linfáticos das células tumorais da glia (Carrera-González et al., 2013) e de células de câncer de mama (Bouallagui et al., 2011); além de seu papel quimiopreventivo no carcinoma de células escamosas da língua (Grawish et al., 2011).

Resultados de trabalhos em que foi avaliada a atividade de extratos de oliveira, indicam que extratos ricos em flavonas, como a diosmetina e luteolina, apresentaram maior atividade anticâncer contra células da mama, concluindo que sua atividade não depende isoladamente de um composto, mas sim de um conjunto (Taamalli et al., 2012b). Também foi observado que o consumo do extrato de folhas de oliveira entre concentrações de 300 a 1000 mg.kg⁻¹ e de oleuropeína nas concentrações de 25 a 85 mg.kg⁻¹ duas vezes ao dia, durante duas semanas, impediu o aumento da espessura da pele induzida pela radiação ultravioleta B (Sumiyoshi e Kimura, 2010).

A atividade antimicrobiana é outra propriedade muito estudada dos compostos presentes nas folhas de oliveira. Autores relatam atividade frente a diversas bactérias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., dentre outras (Korukluoglu et al., 2006; Sudjana et al., 2009; Brahmi et al., 2012a; 2012b; Rafiei et al., 2012).

1.5. Aplicação das folhas em produtos alimentícios

As folhas consistem em aproximadamente 10% do peso total de azeitonas que chegam na indústria para o processamento. Alguns autores estão utilizando este material como uma alternativa para o aumentar o potencial antioxidante em azeites através da adição das folhas durante o processo de extração, com o intuito de melhorar a qualidade tanto no âmbito de características químicas quanto sensoriais (Farag et al., 2003; Farag et al., 2007; Bouaziz et al., 2008; Malheiro et al., 2013).

Paiva-Martins et al. (2007) observaram que 1 kg do extrato das folhas de oliveira pode fortificar de 50 a 320 litros de azeite refinado, obtendo, desta forma, produto com estabilidade idêntica ao de azeite virgem. Malheiro et al. (2013) relataram que adicionando 10% de folhas de oliveira durante a extração do azeite há um aumento de 30% de vitamina E no azeite, concedendo maior resistência oxidativa ao produto final.

Também é observado o uso das folhas de oliveira para alimentação animal ou como combustível de queima para geração de energia (Altioek et al., 2008; Ahmad-Gasem et al., 2013). Paiva-Martins et al. (2014) avaliaram a adição de farinha de folhas de oliveira na dieta de porcos e perceberam reduções nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos, no armazenamento de gordura e no menor peso corporal, sugerindo a utilização deste material na dieta humana. Os autores destacam que as folhas podem ser incorporadas na dieta não somente através de seus extratos, mas também na forma de farinha. Marangoni et al. (2015) avaliaram a suplementação da dieta de frangos com farinha de folhas de oliveira e perceberam que dietas com 10 g.kg⁻¹ de folhas promoveram menor taxa de mortalidade dos animais, e com 5 g.kg⁻¹ induziram na menor conversão alimentar.

Além de sua utilização como farinha na alimentação animal e para extração e melhoramento de azeites de oliva, as folhas são conhecidas a milênios por seu uso na forma de chás. Segundo Özcan e Matthäus (2017), o chá de folhas de oliveira, na região do mediterrâneo, é o mais comumente utilizado entre os povos para curar vários tipos de doenças.

1.6. A era da metabolômica

Com o advento das tecnologias genômicas, proteômicas, transcriptômicas e, mais recentemente, metabolômicas, a maneira de fazer ciências nas diversas áreas de pesquisas vem mudando e se adaptando as formas mais fáceis e rápidas de análise. Contudo é importante entender o que representa cada uma destas técnicas.

A genômica é uma técnica relacionada a resultados sobre a expressão genética, ou seja, a sequência completa do material genético, mais

especificamente o DNA dos organismos. A transcriptômica está relacionada aos RNAs requeridos pelas células, já que os RNAs revelam quais os genes que estão sendo expressos e como a expressão destes podem mudar durante a vida do organismo, diferente do DNA que se mantém estático durante toda a vida (Do Amaral et al., 2006). A proteômica, em sequência da transcriptômica, refere-se ao sistema de proteínas que são sintetizadas depois que o DNA expressa o comando através do RNA, e, portanto, é uma técnica que complementa as duas anteriores, estando associada à elucidação das funções que as proteínas exercem no organismo (Noordin e Othman, 2013).

A metabolômica é uma técnica que utiliza análise quantitativa ou qualitativa, e, portanto, está relacionada a todo o conjunto de metabólitos encontrados nas células, fluidos e/ou tecidos corporais (Koek et al., 2011). Segundo De vos et al. (2007) a análise metabolômica, por ser capaz de identificar e comparar um número grande de compostos em um sistema biológico, é uma técnica de grande importância. Contudo, segundo o autor, quando é avaliado o tecido vegetal, é importante entender que seu complexo sistema não torna possível a extração e detecção em uma só vez de todos os compostos presentes na matriz.

Existem dois métodos de se fazer a análise metabolômica, de forma direcionada ou não. A análise direcionada é feita quando se quer avaliar um grupo específico de metabólitos ou uma rota específica de compostos. Enquanto a análise não-direcionada é realizada quando se deseja obter a visão do perfil total de metabólitos sintetizados em um sistema biológico em determinada condição (Villas-Bôas et al., 2005; Cevallos-Cevallos et al., 2009).

Na área de alimentos a análise metabolômica vem sendo muito empregada para denominação de origem geográfica; para examinar a influência de diferentes condições de cultivo, como solo, clima, irrigação, adubação, dentre outros; e também para identificar alterações genéticas, contaminações ou adulterações (Zorb et al., 2006; Cevallos-Cevallos et al., 2009; Wahyuni et al., 2013).

Autores utilizaram da análise metabolômica para avaliar o perfil metabólico de grãos de trigo cultivados em diferentes métodos, sistema orgânico

e convencional, em mesmas condições de solo e clima (Zorb et al., 2006); e para avaliar a biodiversidade de acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) (Wahyuni et al., 2013).

Devido a trabalhos (Hoffmann, 2016) foi possível discriminar a partir da análise metabolômica por cromatografia líquida, espécies de Butias e suas origens geográficas a partir da composição da polpa dos frutos de forma não direcionada. Aranha (2016) caracterizou acessos de pimentas de forma não direcionada também utilizando cromatografia gasosa, contudo a análise metabolômica não foi eficaz para discriminar as espécies, porém alguns acessos foram diferenciados dos demais por apresentarem maiores teores de sacarose, frutose ou dihidrocapsaicina.

1.7. Metabolismo secundário em plantas

Diferente do metabolismo primário que está relacionado com o armazenamento de energia e manutenção nutricional da vida da planta, o metabolismo secundário está envolvido com a defesa frente a estresses bióticos ou abióticos, chamativos para insetos polinizadores ou dispersores de sementes ou até mesmo promovendo a simbiose entre planta e micro-organismos. Os metabólitos podem ser divididos em três grupos, referentes a suas vias de síntese e suas semelhanças estruturais, sendo eles os terpenoides, compostos fenólicos e os compostos nitrogenados (Taiz e Zeiger, 2013).

Os terpenos são formados através da junção de moléculas de cinco carbonos oriundas das rotas do ácido mevalônico (MEV) e do metileritritol fosfato (MEP). Os terpenos têm ação tanto no crescimento e desenvolvimento das plantas, quanto na defesa delas contra herbívoros (Trapp e Croteau, 2001; Soriano et al., 2004; Veitch et al., 2008). Os terpenoides mais conhecidos são os carotenoides, moléculas formadas por 40 carbonos, constituindo um dos pigmentos mais importantes da natureza devido a suas numerosas funções, largas distribuições e diversidade estrutural (Oliver e Palou, 2000). As variações encontradas de carotenoides em frutas e vegetais geralmente estão relacionados a fatores como a variedade genética, estágio de maturação, local e variações climáticas, dentre outros (Capecka et al., 2005).

Os aminoácidos, principalmente a lisina, tirosina ou triptofano, são as principais moléculas precursoras dos compostos nitrogenados como os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e os glicosinolatos. As principais funções destes compostos estão relacionadas a controle de pragas como herbívoros e apresentam risco toxicológico para os seres humanos (Chen et al., 2008; McSweeney et al., 2008). Segundo (Taiz e Zeiger, 2013) os alcaloides interferem no sistema nervoso, afetam transporte de membrana, a síntese proteica ou a atividade de várias enzimas; enquanto que glicosídeos cianogênicos liberam ácido cianídrico e os glicosinolatos isotiocianato.

Os compostos fenólicos são oriundos da rota do ácido chiquímico, sendo a fenilalanina um intermediário da biossíntese da maioria destes compostos (Oliveira e Bastos, 2011). Dentro deste grande grupo estão presentes os ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, ligninas e taninos. Os flavonoides são sintetizados através da rota do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. Os taninos se dividem entre hidrolisáveis e condensados, sendo o primeiro constituído de polímeros heterogêneos que contem ácidos fenólicos e o segundo resultante da polimerização de unidades de flavonoides. As antocianinas são glicosídeos que podem apresentar vários açúcares e as ligninas são polímeros de álcoois de fenilpropanoides altamente ramificados (Taiz e Zeiger, 2013).

2 Capítulo 1 – Artigo de revisão

Potencial biológico da oleuropeína

OTERO¹, DM; LORINI¹, A; OLIVEIRA¹, FM; ANTUNES², BF; ZAMBIAZI³ RC.

¹Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFPel, Campus Capão do Leão, CEP: 96010-900 –Pelotas– RS – Brasil, Telefone: (53) 32757258 – Fax: (53) 32757258;

²Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos – UFPel, Campus Porto, CEP: 96010-610 – Pelotas– RS – Brasil, Telefone: (53) 32843835 – Fax: (53) 32843835;

³Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – UFPel, Campus Capão do Leão, CEP: 96010-900 –Pelotas– RS – Brasil, Telefone: (53) 32757258 – Fax: (53) 32757258;

Abstract: It is known that olive fruits and virgin olive oils are a good source of polyphenols and other antioxidants that have aroused increasing interest. An oleuropein, o-dihydroxyphenolic glycoside, is one of the main phenolic compounds identified in fruits and leaves of olive. Oleuropein has several pharmacological properties, including antioxidants, cardioprotective, neuropathic, anticancer and others. In addition, its derivatives are responsible for the bitter and spicy taste of green fruits of olives and virgin olive oils. In the physiology of the olive tree, an enzymatic biotransformation of the oleuropein is related to a maturation of the fruit and to the tissue-specific defense mechanism.

Key-words: pharmacological properties, olive leaves, phenolic compounds.

Resumo: Sabe-se que os frutos da oliveira e os azeites virgens derivados são boas fontes de polifenóis e outros antioxidantes que tem despertado interesse crescente. A oleuropeína, glicosídeo o-dihidroxifenólico, é um dos principais compostos fenólicos identificados em frutos e folhas de azeitona. A oleuropeína apresenta várias propriedades farmacológicas, incluindo efeitos antioxidantes,

cardioprotetores, neuropáticos, anticâncer e outros. Além disso, seus derivados são responsáveis pelo gosto amargo e picante de frutos verdes de olivas e de azeites virgens. Na fisiologia da planta de oliveira, a biotransformação enzimática da oleuropeína está relacionada com a maturação do fruto e com o mecanismo de defesa específico do tecido.

Palavras chaves: propriedades farmacológicas, folhas de oliveira, compostos fenólicos.

Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore frutífera classificada na família botânica Oleaceae, característica da região Mediterrânea, que é utilizada para fins ornamentais e para a produção de azeite de oliva (Fares et al., 2011; Lalas et al., 2011). Além de seus frutos, as folhas de oliveira também fornecem componentes considerados importantes para a saúde humana, e por isso o interesse acerca das folhas tem aumentado, especialmente pelo seu elevado conteúdo de polifenóis, os quais exercem efeitos benéficos à saúde (Kiritsakis et al., 2010).

As folhas de oliveira (*Olea europea* L.) são ricas em compostos fenólicos, dentre os quais está em maior concentração a oleuropeína (Aouidi et al., 2012; Al-Azzawie, et al., 2006) a qual é um éster do ácido elenólico e 3,4-dihidroxifenil etanol (Tan et al., 2003) que, após ser ingerida, é convertida para hidroxitirosol, que caracteriza-se como um composto com importante atividade antioxidante (Zoidou et al., 2014). Diversos autores relatam que a oleuropeína apresenta importantes propriedades como: anti-inflamatória (Visioli et al., 1998), antimicrobiana (Tripoli et al., 2005), antioxidante (Visioli et al., 2002), antiviral (Micol et al., 2005), dentre outras.

As características da oleuropeína despertam crescente interesse nos métodos de extração, de separação, de purificação e a aplicação nas mais diversas áreas (alimentícia, cosmética e farmacêutica). Na indústria alimentícia, a oleuropeína pode ser usada para prevenir a oxidação em alimentos, principalmente em produtos ricos em lipídeos, uma vez que apresenta a capacidade de sequestrar radicais livres (Xynos, et al., 2012).

Características

A oleuropeína consiste em um polifenol pertencente a um grupo específico de compostos semelhantes a cumarina, os secoiridoides. Os secoiridoides são produzidos pelo metabolismo secundário dos terpenos e formados a partir de um álcool feniletíl (hidroxitirosol e tirosol), do ácido elenólico e, eventualmente, de resíduos aglucosídicos.

A oleuropeína ($C_{25}H_{32}O_{13}$) é um éster de hidroxitirosol e glucosido de ácido elenólico (um esqueleto oleosídico comum aos glucosídeos secoiridoides de *Oleaceae* (Figura 1); composto fenólico não tóxico de massa molecular 540,54 g.mol⁻¹. Esta molécula é pouco volátil mas é termolábil, podendo se degradar à partir de 80°C, instável na presença de oxigênio e à luz, possui uma alta solubilidade em água e uma baixa solubilidade em óleo, apresenta aparência cristalina em sua forma pura e é relativamente inodora (Montedoro et al., 1993; Soler-Rivas et al., 2000; Segura-Carretero et al., 2010; Walter et al, 1973; Japón-Luján et al., 2006; Pereira et al., 2007; Ansari et al., 2011).

A oleuropeína é um composto presente no metabolismo especializado de plantas do gênero *Olea*, sendo observado em plantas da família *Oleaceae* (oliveira), assim como em gêneros como o *Jasminum* e *Fraxinus* (Calis et al., 1993; Damtoft et al., 1993; Tanahashi et al., 1996). Nas oliveiras o conteúdo de oleuropeína é influenciada pela variedade, clima, grau de maturação das azeitonas no momento da colheita, sistema de processamento e tipo de produto de oliva (Hassen, et al 2015). Nas folhas a concentração de oleuropeína é em torno de 60-90 mg.g⁻¹ (Le Tutour, 1992).

Relatos na literatura apontam que a oleuropeína apresenta um alto poder antioxidante, propriedade anti-inflamatória, ação hipotensiva, hipoglicemiante e hipouracêmica, bem como ações farmacológicas benéficas à saúde como antimicrobiana, antiviral e antitumoral, além de inibir o aumento da fração LDL (Low Density Lipoprotein) no sangue (Bisignano et al., 1999; Benavente-Garcia et al., 2000; Andrikopoulos et al., 2002; Micol et al., 2005; Al-Azzawie et al., 2006).

Biossíntese e degradação

O estudo sobre a síntese da oleuropeína começou após ela ser relatada pela primeira vez em 1960, e desde então se acredita que nas plantas da família das *Oleaceae* a oleuropeína seja derivada do ácido mevalônico (MVA), o qual é convertido por uma série de reações que incluem oxidações, reduções, glicosilações e metilações (Jensen et al., 2002; Ryan et al., 2002).

A oleuropeína representa, em sua síntese, um ponto de encontro entre a síntese de terpeno e síntese fenólica (Ryan et al., 2002). Contudo, estudos recentes apontam que muitas das reações para a síntese da oleuropeína ainda são desconhecidas, o que torna impróprio excluir rotas de biossíntese alternativa da oleuropeína (Alagna et al., 2012). Ryan et al. (2002) apontam que a fração de hidroxitirosol, ou seja, a fração fenólica presente na oleuropeína deriva da hidroxilação da aglicona ligstroside, sendo o tirosol (composto derivado da tirosina) o principal precursor fenólico da oleuropeína. Damtoft et al. (1993) salienta que a conversão biossintética é lenta, provavelmente em função da translocação dos precursores pelos tecidos da planta. No entanto, Alagna et al. (2012) relatam que o ligstrósido talvez seja um derivado e não um precursor da oleuropeína.

A degradação da oleuropeína (Figura 2) pode ocorrer via enzimática e/ou química, culminando com a formação de compostos como o hidroxitirosol, ácido elenólico e dimetil oleuropeína, sendo este último resultante da desmetilação da oleuropeína (Briante et al., 2001; Servili et al., 2004; Alagna et al., 2012).

A oleuropeína é um composto abundante nos estádios iniciais de frutos da oliveira. Durante o crescimento e amadurecimento das azeitonas existem três fases distintas, em que na primeira há acúmulo de oleuropeína (crescimento) e na segunda e terceira há redução dos níveis deste composto (maturação) (Amiot et al., 1989). Estudos recentes relatam que durante a maturação das azeitonas de muitas cultivares de oliveiras, a oleuropeína é degradada em hidroxitirosol, ácido elenólico e dimetil oleuropeína (Yorulmaz et al., 2013). Ortega-Garcia et al. (2008) observaram que durante o processo de maturação dos frutos ocorreu queda nas concentrações de oleuropeína; no entanto, nas folhas das oliveiras, durante o mesmo período, ocorreu aumento da concentração deste composto. Os autores sugerem que pode haver uma interação entre a oleuropeína e as

polifenoloxidasas (POP), convertendo a oleuropeína em compostos que tenham ação na desnaturação, reticulação ou alquilação de proteínas, os quais podem apresentar efeitos protetores contra herbívoros.

Os produtos de degradação da oleuropeína podem ser diferentes em função do tipo de enzima que atua sobre este composto. A β -glicosidade (EC 3.2.1.21) forma a oleuropeína aglicona ou a decarboximetil oleuropeína aglicona, através da liberação da glicose; enquanto que as esterases produzem derivados glucosil, como o hidroxitirosol e ácido elenólico, através da hidrólise das ligações ésteres presentes na oleuropeína (Wang et al., 2009). As oxidoredutases, peroxidases e polifenoloxidasas, promovem o escurecimento através da oxidação de o-diidroxifenóis para o-quinones (Segovia-Bravo et al., 2009). Contudo, segundo Ortega-Garcia et al. (2008) as polifenoloxidasas não estão relacionadas com a queda nos níveis de oleuropeína em frutos durante a maturação, sendo observado tempos diferentes em relação a maior expressão da enzima e altas concentrações do composto.

Estudos de De Leonardis et al. (2015) revelaram que a presença simultânea de oleuropeína and hidroxitirosol faz com que o segundo composto tenha um efeito inibitório na ação das polifenoloxidasas. Segundo Gutierrez-Rosales et al. (2010), a síntese de oleuropeína está relacionada com a hidrólise enzimática causada pela β -glicosidase, enzima presente em varias etapas e na formação de compostos. As glicosiltransferases são consideradas como as catalisadoras da formação de oleuropeína através de oleuropeína aglicona (Alagna et al., 2012).

Atualmente pesquisadores buscam identificar os genes responsáveis pela expressão gênica que aumenta a produção de oleuropeína, visando melhoria genética para o aumento das concentrações do composto e também para aplicação em engenharia metabólica em hospedeiros microbianos ou plantas (Alagna et al., 2016).

Aspectos biológicos

A oleuropeína é facilmente absorvida pelo organismo humano, e portanto, assim como outros compostos fenólicos presentes na oliveira, grande parte da

oleuropeína ingerida é absorvida (Vissers et al., 2002), podendo assim, participar de várias funções no organismo.

Estresse oxidativo

Sendo um composto fenólico a oleuropeína é reconhecida principalmente por ser um antioxidante, atuando na eliminação de radicais livres (Cicerale et al., 2012). Isto se deve principalmente à presença de grupos hidroxila na sua estrutura química, particularmente na fração 1, 2-di-hidroxibenzeno. Os grupos hidroxila podem doar hidrogênio para evitar a oxidação da molécula (Hassen et al., 2015).

et al. (2014) consideraram a relação estrutura-atividade antioxidante para estudar a atividade de eliminação radical da oleuropeína e seus derivados provenientes da oliveira usando a teoria funcional da densidade (DFT). No estudo foi identificada uma posição radical única (C₃) na oleuropeína, caracterizada por baixa entalpia de dissociação de ligação e de densidade de rotação, além da capacidade de distribuição de elétrons.

A administração oral de extratos ricos em polifenóis derivados de folhas de oliveira induziu no aumento do potencial antioxidante dos níveis de lipídios séricos e nas atividades hepáticas das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol (Jemai et al., 2008a).

Em estudo visando investigar o potencial efeito preventivo da oleuropeína em uma toxicidade experimental de arsênio em camundongos, Ogun et al. (2016) verificaram que a oleuropeína melhorou o dano tecidual oxidativo pela eliminação de radicais livres. Neste estudo, o nível de óxido nítrico no sangue e nos tecidos diminuiu, enquanto o conteúdo de malondialdeído cerebral aumentou, em ratos tratados com arsênio. Ainda, a imunorreatividade para óxido nítrico sintase induzíveis (iNOS) e para as óxido nítrico sintase endoteliais (eNOS), aumentou com o tratamento com arsênio, além de que a coloração imuno-histoquímica também demonstrou redução da expressão de iNOS e eNOS no fígado.

As atividades de antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRx), catalase (CAT)

e o nível de antioxidantes não enzimáticos como a glutatona (GHS), α -tocoferol, β -caroteno e ácido ascórbico, em coelhos de aloxano-diabéticos, apresentaram um aumento (Al-Azzawie et al., 2006).

Muitos outros estudos demonstraram as propriedades antioxidantes da oleuropeína, como da redução do estresse oxidativo envolvido em hemorragia intracerebral (Shi et al., 2017), da capacidade de proteger as células musculares contra o estresse induzido por H_2O_2 nas células (Hadrich et al., 2016), da inibição da produção de espécies reativas de oxigênio no núcleo paraventricular (PVN) associado a hipertensão (Sun et al., 2017), e do efeito no estresse oxidativo induzido por lesão de reperfusão isquêmica em coração de rato (Esmailidehaj et al., 2016).

Obesidade

Hadrich et al. (2016) objetivaram avaliar o efeito da oleuropeína no nível de adiponectina na obesidade induzida por dieta hipercolesterolêmica em ratos e o mecanismo molecular subjacente à sua ativação, e observaram que a oleuropeína induziu na redução do peso corporal, na massa de tecido adiposo, de triglicerídeos e da esteatose hepática, e no aumento da concentração sérica de adiponectina. Com isso foi sugerido que a oleuropeína exerce importante efeito anti-obesidade em ratos com dieta hipercolesterolêmica por ativação da proteína quinase pela adenosina monofosfato (AMPK), e pela supressão da expressão de PPAR γ (receptor de proliferador de peroxisoma γ) nos tecidos adiposos.

Diabetes

A sinalização celular oxidativa vinculada ao estresse está fortemente associada ao metabolismo anormal da glicose (Valko et al., 2007). A oleuropeína foi diagnosticada como possível componente preventivo de diabetes e promotora da redução da concentração de glicose no sangue, podendo ser utilizada no tratamento de sintomas hiperglicêmicos e no aumento da atividade antioxidante (Wainstein et al., 2012). Sangi et al. (2015) introduziram diabetes em ratos por estreptozotocina (STZ) e verificaram que a ingesta de oleuropeína reduziu

significativamente os níveis séricos de glicose nestes animais. Liu et al. (2014a) descreveram que a ingesta de oleuropeína aumentou a resistência à insulina em diabetes induzida por dieta de alta gordura em ratos, reduzindo o fator de necrose tumoral alfa e da interleucina-6, a qual é associada ao processo inflamatório.

Colesterol

Coelhos com dieta hipercolesterolêmica, após tratamento durante seis semanas com oleuropeína (10 ou 20 mg.(kg x d)⁻¹), apresentaram redução no colesterol total e nas concentrações de triglicerídeos (Andreadou et al., 2006). Jemai et al. (2008a) testaram o efeito em ratos alimentados com dieta rica em colesterol, e verificaram que a hiperlipidemia induzida por esta dieta resultou na elevação do colesterol total (TC), triglicerídeos (TG) e colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C). A administração de extratos de folhas de oliveira, ricos em oleuropeína e polifenóis reduziu significativamente os níveis séricos de TC, TG e LDL-C e aumentou o nível sérico de colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL-C).

Câncer

Neuroblastoma é um dos tipos mais comuns de tumores pediátricos que podem se espalhar rapidamente nos tecidos neuronais. Estudos avaliando o efeito terapêutico da oleuropeína na proliferação celular, na invasão, na formação de colônias, no ciclo celular e nos mecanismos apoptóticos na linha celular de neuroblastoma SH-SY5Y em condições “in vitro”, demonstraram que a oleuropeína pode ser um agente terapêutico no tratamento do neuroblastoma. Foi observado que a oleuropeína provocou a prisão do ciclo celular por regulação negativa de CylinD1, CylinD2, CyclinD3, CDK4, CDK6; regulação positiva das expressões de genes p53 e CDKN2A, CDKN2B, CDKN1A; indução de apoptose por inibição de Bcl-2; ativação de expressões de genes Bax, caspase-9 e caspase-3; redução da invasão em células SH-SY5Y; e supressão do número de colônias (Seçme et al., 2017).

A quimioterapia à base de cisplatina é responsável por um grande número de falhas renais, e ainda está associada a altas taxas de mortalidade. Estudos com a ingesta de oleuropeína apontaram uma proteção contra a nefrotoxicidade induzida por cisplatina em ratos, além de ser observada atividade citoprotetora significativa (Geyikoglu et al., 2017).

Hipertensão

A hipertensão está associada à produção aumentada de espécies de oxigênio reativo (ROS) no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (Sun et al., 2017). Em ratos espontaneamente hipertensos, foi realizada a administração de oito semanas de 60 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de oleuropeína, e como resposta foi observado um aumento do sistema de defesa antioxidante no PVN nos ratos (Sun et al., 2017).

Hepatite B

Jasminum officinale L. da variedade *Grandiflorum* (JOG) é uma planta da família Oleaceae, que na medicina popular é utilizada para o tratamento da hepatite no sul da China. Estudos demonstraram que a oleuropeína obtida das flores de JOG bloqueia efetivamente a secreção de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em células HepG2 2.2.15 de uma forma dose-dependente. Observou-se também que a aplicação intraperitoneal de 80 mg.kg⁻¹ de oleuropeína, aplicada duas vezes ao dia, reduziu a viremia em patos infectados com vírus da hepatite B na ausência de quaisquer sinais de toxicidade (Zhao et al., 2009).

Hemorragia cerebral - AVC

Shi et al. (2017) avaliaram a ingesta de oleuropeína em um modelo animal de hemorragia intracerebral de ratos Sprague-Dawley, desde os sintomas gerais até o mecanismo molecular detalhado. A partir do tratamento com oleuropeína observou-se um alívio do estresse oxidativo no déficit neurológico associado a hemorragia intracerebral e edema cerebral de maneira dependente da dose.

Desta forma, pode-se preservar a estrutura da barreira hematocefálica e suavizar o estresse oxidativo, podendo portanto, ser utilizada como um agente terapêutico promissor para a hemorragia intracerebral.

Miocardite

A miocardite é uma doença cardiovascular comum e uma das principais causas de cardiomiopatia dilatada. No estudo de Zhang et al. (2017) foi induzida miocardite em ratos e aplicado a ingesta de oleuropeína. Os resultados sugerem que a oleuropeína efetivamente impede o desenvolvimento de miocardite com a inibição das respostas inflamatórias mediadas por proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e pelo fator nuclear kappa-B (NF- κ B). Com a miocardite, citocinas segregadas de imunócitos ativadas destroem a funcionalidade dos cardiomiócitos e as células inflamatórias magnificam a reação inflamatória cardíaca (Amoah et al., 2015; Christia et al., 2013). O fator nuclear kappa-B (NF- κ B) é um dos pontos de conversação cruzada de múltiplas vias inflamatórias do sinal que tocam papéis fundamentais na regulação da expressão de citocinas (Kulms et al., 2006), pois controla a produção de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (Giner et al., 2013; Killeen et al., 2013). As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) atuam na imunidade, na alteração dos níveis de tradução e na expressão de várias citocinas pró-inflamatórias (Tiedje et al., 2014).

Alzheimer

Fragmentos de Amiloide- β (A β), os agregados de A β oligoméricos e os peptídeos piroglutamilados- A β , os mecanismos epigenéticos e a disfunção de autofagia, parecem contribuir de diversas formas para a doença de Alzheimer (Luccarini et al., 2015). Grossi et al. (2013) observaram um efeito benéfico da aglicona de oleuropeína na redução da neurodegeneração associada a Alzheimer. Os autores demonstraram que a suplementação dietética de oleuropeína aglicona melhora fortemente o desempenho cognitivo em ratos transgênicos TgCRND8 jovens e de meia idade, reduz os níveis de A β 40 e A β 42, além de reduzir o tamanho e a compacidade das placas de amiloide A β . Foi

também destacada uma melhoria da memória episódica não-espacial e da memória funcional, em conjunto com a melhoria dos aspectos neuropatológicos corticais e uma indicação de autofagia que protege os neurônios da citotoxicidade induzida por A β .

Parkinson

A doença de Parkinson consiste em uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (Pasban-Aliabadi et al., 2013). Pasban-Aliabadi et al. (2013), com a utilização de um modelo in vitro de doença de Parkinson, que consiste em toxicidade induzida por 6-hidroxidopamina no feocromocitoma adrenal de ratos, relataram que a oleuropeína reduziu o ROS intracelular, a caspase 3 ativada, a razão Bax / Bcl-2 e a fragmentação de DNA em células tratadas com oleuropeína. Os efeitos protetores da oleuropeína são relacionados à suas propriedades anti-oxidativas e anti-apoptóticas e sugerem seu potencial terapêutico no tratamento da doença de Parkinson.

Fibrilas de colágeno

As fibrilas de colágeno podem se acumular em quantidades excessivas e prejudicar o funcionamento normal dos órgãos, e esse acúmulo é uma marca registrada de fibrose cardíaca, de quelóides e de esclerodermia sistêmica. Na fibrose cardíaca, a acumulação de fibrilas de colágeno nos vasos sanguíneos leva ao espessamento das artérias e alteração da arquitetura e da função cardíaca (Krenning et al., 2010). Bharathy e Fathimau (2017) investigaram o efeito inibidor da oleuropeína na formação de fibrilas de colágeno, e encontraram uma redução substancial na formação de fibrilas, sugerindo o efeito da oleuropeína na auto-montagem de colágeno; e também observaram que a formação de fibrilas de colágeno foi inibida de forma crescente em função do aumento da concentração de oleuropeína.

Cistite Hemorrágica

A cistite hemorrágica é uma complicação devastadora observada em pacientes após tratamentos quimioterápicos convencionais que incluem agentes alquilantes de oxazafosforina, como a ifosfamida e a ciclofosfamida (CYP) (Altayli et al., 2012; Sinanoglu et al., 2012). Estudos demonstraram que o CYP induziu a inflamação urinária na mucosa e no tecido conjuntivo submucoso da bexiga, induzindo a danos vasculares, subseqüentes hemorragias, ulceração e erosão da mucosa (Boeira et al., 2011; Moraes et al., 2013; Sherif et al., 2016). Foi observado que a oleuropeína neutralizou os efeitos nocivos da ciclofosfamida na bexiga, possivelmente devido às suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, exercendo um efeito uroprotetor definitivo contra a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em ratos (Sherif et al., 2016).

Conclusões

As folhas de Oliveira (*Olea europae L*) apresentam em sua composição, diversos compostos de interesse como fenóis simples e outros de estruturas mais complexas. Dentre eles um dos grandes destaques é a oleuropeína, a qual possui estrutura química mais complexa, está presente em maior abundância nas folhas de oliveira e apresenta sabor amargo no fruto imaturo. Este composto atua na prevenção de doenças cardíacas, como antioxidante natural, possui propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, além disso, juntamente com o hidroxitirosol, apresenta efeito sinérgico com as vitaminas E e C. De acordo com as informações acerca da oleuropeína, pode-se verificar que este composto possui diversas propriedades benéficas à saúde e por isso tem se mostrado um composto de destaque para as pesquisas nas mais diversas áreas de fármacos, alimentos e de cosméticos.

Referências bibliográficas

- ALAGNA, F. et al. Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropeína biosynthesis in olive (*Olea europaea* L) fruits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5542-5554, 2016.
- ALAGNA, F. et al. Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. **BMC plant biology**, v. 12, n. 1, p. 162, 2012.
- AL-AZZAWIE, H. F. et al. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropeína in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v. 78, n. 12, p. 1371-1377, 2006.
- ALTAYLI, E. et al. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **UPB Science Bulletin**, Series B, v. 74, n. 2, p. 1454-2331, 2012.
- AMIOT, M. J. et al. Accumulation of oleuropeína derivatives during olive maturation. **Phytochemistry**, v. 28, n. 1, p. 67-69, 1989.
- AMOAHA, B.P. et al. Immunopathogenesis of myocarditis: the interplay between cardiac fibroblast cells, dendritic cells, macrophages and CD4+ T cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2015.
- ANDREADOU, I. et al. The olive constituent oleuropeína exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. **The journal of nutrition**, v. 136, n. 8, p. 2213-2219, 2006.
- ANDRIKOPOULOS, N. et al. Oleuropeína inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. **LWT-Food Science and Technology**, v. 35, n. 6, p. 479-484, 2002.
- ANSARI, M. et al., Development of a Simple Green Extraction Procedure and HPLC Method for Determination of Oleuropein in Olive Leaf Extract Applied to a Multi-Source Comparative Study. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 8, p. 38-47, 2011.

- AOUIDI, F. et al. Rapid quantitative determination of oleuropeína in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 292-297, 2012.
- BHARATHY, H. et al. Exploiting oleuropeína for inhibiting collagen fibril formation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 179–186, 2017.
- BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 457-462, 2000.
- BISIGNANO, G. et al. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropeína and hidroxitirosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 8, p. 971-974, 1999.
- BOEIRA, V. T. et al. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 384, n. 3, p. 265, 2011.
- BRIANTE, R. et al. Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropeína hydrolysis by hyperthermophilic β -glycosidase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3198-3203, 2001.
- CALIS, I. et al. Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1453-1456, 1993.
- CHRISTIA, P. et al. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. **European journal of clinical investigation**. v. 43, n. 9, p. 986-995, 2013.
- CICERALE, S. et al. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 129-135, 2012.
- DAMTOFT, S. et al. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1291-1299, 1993.
- DE LEONARDIS, A. et al. Evidence of oleuropeína degradation by olive leaf protein extract. **Food chemistry**, v. 175, p. 568-574, 2015.

ESMAILIDEHAJ, M. et al. Effect of oleuropein on myocardial dysfunction and oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury in isolated rat heart. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 7, n. 4, p. 224-230, 2016.

FARES, R, et al. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 58-63, 2011

GEYIKOGLU, F. et al. Effect of oleuropeína against chemotherapy drug-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damages in rat kidney injury. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 2, p. 447-459, 2017.

GINER, E, et al. Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1113-1120, 2013.

GONÇALVES, P. M. F. **Efeitos de metabolitos de fenóis do azeite no dano oxidativo em eritrócitos humanos**. 2013. 77p. Mestrado em Bioquímica. Universidade do Porto.

GROSSI, C. et al. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71702, 2013.

GUTIERREZ-ROSALES, F. et al. Metabolites involved in oleuropeína accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12924-12933, 2010.

HADRICH, F. et al. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. **Chemico-biological interactions**, v. 252, p. 54-60, 2016.

HASSANZADEH, K. et al. The role of structural C-H compared with phenolic OH sites on the antioxidant activity of oleuropeína and its derivatives as a great non-flavonoid family of the olive components: A DFT study. **Food Chemistry**, v.164, n.1, p.251-258, 2014.

HASSEN, I. et al. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 926-940, 2015.

JAPÓN-LUJÁN, R. et al. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropeína and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 76-82, 2006.

JAPÓN-LUJÁN et al. Multivariate optimisation of the microwave- assisted extraction of oleuropeína and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, n. 2, p. 185-191, 2006.

JEMAI H, et al. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropeína and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. **Chemico-biological interactions**, v. 176, n. 2, p. 88-98, 2008.

JENSEN, S. R et al. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 213-231, 2002.

KILLEEN, M. J. et al. NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: Exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. **Drug discovery today**, v. 19, n. 4, p. 373-378, 2014.

KIRITSAKIS, K., et al. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 4, p. 369-376, 2010.

KRENNING, G. et al. The origin of fibroblast and mechanism of cardiac fibrosis. **Journal of cellular physiology**, v. 225, n. 3, p. 631-637, 2010.

KULMS, D. et al. NF- κ B and cytokines. **Vitamins and Hormones**. v. 74, p.283–300, 2006..

LALAS, S. et al. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1521-1525, 2011.

LE TUTOUR, B. et al., Antioxidative activities of Olea europaea leaves and related phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1173-1178, 1992.

LIU, Y, N. et al. Olive leaf extract suppresses messenger RNA expression of proinflammatory cytokines and enhances insulin receptor substrate 1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet-induced diabetes. **Nutrition Research**, v. 34, n. 5, p. 450-457, 2014.

LUCCARINI, I. et al. Oleuropeína aglycone protects against pyroglutamylated-3 amyloid- β toxicity: biochemical, epigenetic and functional correlates. **Neurobiology of Aging**, v.36, n 2, p. 648-663, 2015.

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

MONTEDORO, G. et al. Simple and hydrolysable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 2228-2234, 1993.

MORAES, J. P. et al. The ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.) reduces urinary bladder damage during cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

OGUN, W. et al. Oleuropein ameliorates arsenic induced oxidative stress in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 36, p. 1-6, 2016.

ORTEGA-GARCÍA, F et al. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropeína concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. **Tree physiology**, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2008.

PASBAN-ALIABADI, H. et al. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein. **Rejuvenation research**, v. 16, n. 2, p. 134-142, 2013.

PEREIRA, A. et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. **Molecules**, v. 12, p. 1153–1162, 2007.

RYAN, D. et al. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6716-6724, 2002.

SANGI, S. M. A. et al. Antihyperglycemic effect of thymoquinone and oleuropein, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in experimental animals. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. Suppl 2, p. S251, 2015.

SEÇME, M. et al. Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*, v. 585, n. 1, p. 93-99, 2016.

SEGOVIA-BRAVO, K et al. Browning reactions in olives: mechanism and polyphenols involved. *Food Chemistry*, v. 114, n. 4, p. 1380-1385, 2009.

SEGURA-CARRETERO, A. et al. Polyphenols in olive oil: the importance of phenolic compounds in the chemical composition of olive oil, in: V.R.P.R.Watson (Ed.), **Olives Olive Oil Health and Disease Prevention**, Academic Press, San Diego, p.167–175, 2010.

SERVILI, M. et al. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 113-127, 2004.

SHERIF, I. A. et al. SHERIF, Iman O. et al. Uroprotective effect of oleuropein in a rat model of hemorrhagic cystitis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 74, p. 12-17, 2016.

SHI, J. et al. Oleuropein Protects Intracerebral Hemorrhage-induced Disruption of Blood-brain Barrier through Alleviation of Oxidative Stress. **Pharmacological Reports**, 2017.

SINANOGU, O. et al. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1392. e1-1392. e6, 2012

SOLER-RIVAS, C. et al. Oleuropeína and related compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1013-1023, 2000.

SUN, W. et al. Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 556-566, 2017.

TAN, H. et al. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 1, p. 187-191, 2003.

TANAHASHI, T. et al. Two dimeric secoiridoid glucosides from *Jasminum polyanthum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1341-1345, 1996.

TIEDJE, C. et al. The role of mammalian MAPK signaling in regulation of cytokine mRNA stability and translation. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 34, n. 4, p. 220-232, 2014.

TRIPOLI, E. et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. **Nutrition research reviews**, v.18, n.1, p. 98-112, 2005.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VISIOLI, F. et al. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. **Life sciences**, v. 62, n. 6, p. 541-546, 1998

VISIOLI, F. et al. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. **Medicinal research reviews**, v. 22, n. 1, p. 65-75, 2002

VISSERS, M.N., et al. Olive oil phenols are absorbed in humans. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 3, p. 409-417, 2002.

WAINSTEIN, J. et al. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 7, p. 605-610, 2012.

WALTER, W. M. et al. Preparation of Antimicrobial Compounds by Hydrolysis of Oleuropeína from Green Olives. **Applied Microbiology**, v.26, n.5, p.773-776, 1973.

WANG, W. et al. Developmental expression of β -glucosidase in olive leaves. **Biologia plantarum**, v. 53, n. 1, p. 138, 2009.

XYNOS, N. et al. Development of a green extraction procedure with super subcritical fluids to procedure extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The journal of supercritical Fluids**, v. 67, p. 89-2012.

YORULMAZ, A. et al. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 5, p. 647-658, 2013.

ZHANG, J. Y. et al. Oleuropein prevents the development of experimental autoimmune myocarditis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 187-195, 2017.

ZHAO, G. et al. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 2, p. 265-268, 2009.

ZOIDOU, E. et al. Oleuropeína as a bioactive constituent added in milk and yogurt. **Food Chemistry**, 158, p 319-324. 2014.

Figuras referentes ao artigo

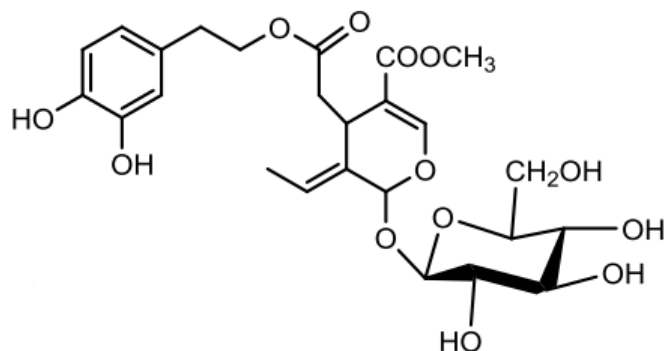


Figura 1: molécula de oleuropeína (Gonçalves, 2013)

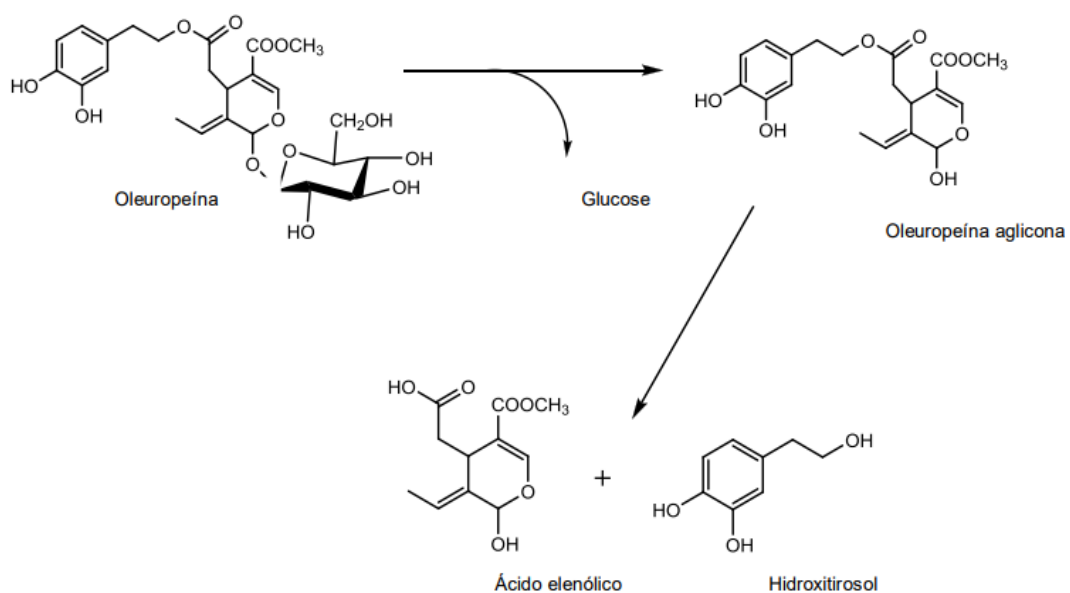


Figura 2: Formação de hidroxitirosol a partir da molécula de oleuropeína (Gonçalves, 2013)

3 Capítulo 2 – Pesquisa de bancada

Perfil metabolômico de folhas de oliveiras de diferentes cultivares e épocas de coleta

Alexandre Lorini⁽¹⁾, Bruna da Fonseca Antunes⁽²⁾, Bianca Camargo Aranha⁽¹⁾, Andressa Carolina Jacques⁽³⁾ e Rui Carlos Zambiasi⁽⁴⁾

⁽¹⁾Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, Brasil, alexandrelorini@hotmail.com, bianca_camargo@live.com

⁽²⁾Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, Brasil, brunafonsecaantunes@gmail.com

⁽³⁾Universidade Federal do Pampa, campus de Bagé, Bagé, Brasil, andressajacques@hotmail.com

⁽⁴⁾Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, Brasil, zambiasi@gmail.com

Resumo – As folhas de oliveira contêm quantidades apreciáveis de compostos bioativos, os quais estão relacionados com o sistema de defesa das plantas e com diversas ações no organismo humano. As mudanças climáticas durante as estações do ano provocam estresses, os quais funcionam como mecanismos de ativação das rotas de sínteses destes compostos. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar perfil metabólico de folhas de cultivares de oliveira (Arbequina, Manzanilla e Picual) coletadas nas quatro estações do ano (outono, inverno, primavera e verão). Foi realizada a determinação do perfil metabolômico (compostos fenólicos, flavonoides, taninos, carotenoides e clorofilas) por espectrofotometria UV-VIS e

fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, além de ensaios de potencial antioxidante. Como resultados foi possível observar que as folhas da cultivar Manzanilla apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e que as folhas coletadas no verão apresentaram uma quantidade de compostos significativamente maiores que as outras. Assim, foi possível concluir que a cultivar e a época de coleta afetam de maneira significativa o conteúdo de bioativos e o potencial antioxidante de folhas de oliveira.

Termos para indexação: estresses abióticos, metabólica, *Olea europaea* L.

Metabolic profile of olive leaves of different cultivars and collection times

Abstract – The olive leaves contain appreciable amounts of bioactive compounds, which are related to the plant defense system and with various actions in the human body. Abiotic stresses act as mechanisms for activating the synthesis routes of these compounds. Therefore, the metabolic profile of leaves of olive cultivars (Arbequina, Manzanilla and Picual) collected in four periods of the year (autumn, winter, spring and summer) was evaluated in this study. The determination of the profile of bioactives (phenolic compounds, flavonoids, tannins, carotenoids and chlorophylls) by spectrophotometry and the metabolic profile by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrum, as well as antioxidant potential tests were performed. As results it was possible to observe that the leaves of the cultivar Manzanilla presented the highest levels of phenolic compounds and that the leaves collected in the summer presented a number of compounds much more relevant than the others. Thus, it was possible to conclude that the cultivar and the collection season significantly affect the bioactive content and the antioxidant potential of olive leaves.

Index terms: abiotic stresses, metabolomics, *Olea europaea* L.

Introdução

Uma das mais antigas plantas cultivadas no mundo é a oliveira (*Olea europaea* L.), sendo encontrada em diversas regiões do globo terrestre, sendo os dois principais produtos oriundos desta planta, o azeite e as azeitonas de mesa, com uma produção estimada em 2017 de aproximadamente 2,95 milhões de toneladas de azeitonas e produzidos 2,89 milhões de toneladas de azeite (IOC, 2018). Contudo, o fruto da oliveira (azeitona) não é a única parte da planta que pode ser aproveitada; as folhas, que são consideradas um coproduto oriundo da produção de azeitonas, podem ser encontradas em grandes quantidades nas indústrias de azeite e nas plantações durante o período de poda das árvores (Govaris et al., 2010; Herrero et al., 2011).

As folhas de oliveiras são consideradas um material rico em compostos bioativos e devido a isto elas se tornam um produto com grande potencial biológico. Alguns produtos já estão sendo elaborados a partir das folhas, os quais estão sendo comercializados em diversas formas (Tsimidou e Papoti, 2010), além disso os extratos das folhas podem ser incorporados em alimentos, utilizados como nutracêuticos e/ou aproveitados pela indústria farmacêutica. Os principais compostos identificados nas folhas de oliveira são da classe dos fenólicos simples, flavonoides e secoiridoides (Talhaoui et al., 2015). Todos estes compostos são originários do metabolismo especializado da planta e possuem função protetiva para a oliveira e para outras plantas em que são sintetizados.

Os estresses abióticos que as plantas são submetidas, como falta ou excesso de água, extremos de frio ou calor, incidência de luz/UV-B, poluentes do ar, ferimentos mecânicos e a deficiência nutricional, produzem radicais livres e por consequência provocam estresses oxidativos nas plantas (Le Gall et al., 2015). Os compostos antioxidantes, como os fenólicos e flavonoides,

tem a função de regular o balanço de radicais livres no organismo da planta e evitar a sua morte (Nakabayashi e Saito, 2015); sendo portanto, responsáveis pelo potencial antioxidante das plantas, atuando como reguladores dos estresses que as plantas passam durante a vida. Estes vários compostos metabólitos presentes nas plantas são uma fonte de estudo para o ramo da metabolômica, e vem se tornando uma ferramenta muito importante para diversas áreas na ciência de alimentos, como a conformidade de regulamentos, processamento, qualidade, segurança e microbiologia (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Com o avanço da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é possível identificar uma gama de compostos muito grande em uma única análise, de forma rápida e precisa. Desta forma, neste estudo foi avaliada a influência no conteúdo de bioativos do metabolismo de três cultivares de oliveiras (Arbequina, Manzanilla e Picual) durante as mudanças de estação do Pampa gaúcho, visando encontrar a melhor cultivar e época do ano para coleta das folhas para possível utilização pela população e/ou indústria.

Material e métodos

Coleta e preparo das amostras

As folhas de oliveiras (*Olea europaea* L.) foram coletadas ao final das estações de outono (Junho/2016), inverno (Setembro/2016), primavera (Dezembro/2016) e verão (Março/2017), as quais constituem as estações do período de um ano (Abril/2016 à Março/2017). Três cultivares foram escolhidas para este trabalho, duas com produção de azeitona destinada a extração de azeite (Arbequina e Picual) e uma com produção de azeitonas de mesa (Manzanilla). Todas as cultivares foram cultivadas sob as mesmas condições agronômicas e ambientais, nos mesmos olivais localizados em uma propriedade privada em Pinheiro Machado (RS) (31°29'59,4" S e 53°30'32,7" O).

100 As folhas foram coletadas das regiões externas de 50 árvores adultas (≤ 5 anos), plantadas com
101 espaçamento de 7 x 5 m, e cultivadas de forma a crescerem com tronco único. Após coletadas,
102 as folhas foram reunidas em um único reservatório e levadas para o Laboratório de
103 Cromatografia da Universidade Federal de Pelotas, localizado na Faculdade de Agronomia
104 Eliseu Maciel (UFPel/Pelotas/RS). O material foi triturado e moído em moinho com auxílio de
105 nitrogênio líquido, armazenado em embalagens de polietileno e mantido a -80°C .

106

107 **Determinação do perfil metabolômico**

108 *Compostos fenólicos:* A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando a
109 metodologia de Singleton e Rossi (1965), com adaptações. Para a extração foi utilizado metanol
110 PA, e a amostra mantida sob agitação durante 24 horas à 25°C no escuro. Para a reação foi
111 utilizado Folin-Ciocalteu e NaCO_3 20%, com reação de 2 horas e leitura a 765 nm em
112 espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705). Para a quantificação foi utilizada uma
113 curva de calibração com padrão de ácido gálico (5 a 140 mg.L^{-1}), e os resultados foram
114 expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (mg EAG.g^{-1}).
115 1).

116 *Flavonoides:* Para determinação do total de flavonoides foi utilizada a metodologia de Funari
117 e Ferro (2006), em que foi obtido um extrato etanólico, seguindo os mesmos parâmetros do
118 extrato obtido para os compostos fenólicos. A reação foi realizada utilizando AlCl_3 com tempo
119 de 40 minutos e leitura no comprimento de 415 nm em espectrofotômetro UV-VIS (modelo
120 JENWAY 6705). Para a quantificação, uma curva de calibração foi obtida utilizando quercetina
121 como padrão (5 a 100 mg.L^{-1}). Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de
122 quercetina por grama de amostra seca (mg EQ.g^{-1}).

123 *Taninos hidrolisáveis:* A quantificação de taninos hidrolisáveis seguiu metodologia descrita por
124 Brune et al. (1991), utilizando o mesmo extrato obtido para a análise de compostos fenólicos.

125 A análise foi feita através de uma reação do extrato com uma solução FAZ (uréia:acetato, goma
126 arábica e sulfato férrico de amônio) durante 15 minutos, e leitura final a 680 nm em
127 espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705). Para a quantificação uma curva de
128 calibração foi obtida utilizando ácido gálico como padrão (0 a 400 mg.L⁻¹), e os resultados
129 foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (mg
130 EAG.g⁻¹).

131 *Taninos condensados:* O teor de taninos condensados foi obtido pelo método de Price et al.
132 (1978), utilizando metanol acidificado com 1% de HCl para extração dos compostos, sendo que
133 a solução de extração foi mantida sob agitação constante por 2 horas, e centrifugada por 10
134 minutos a 5700xg. Para a reação o sobrenadante foi recolhido e adicionado de vanilina, sendo
135 que para cada amostra um branco utilizando metanol acidificado com 4% de HCl foi preparado.
136 A leitura foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705), após
137 20 minutos de reação em banho termostático à 30°C. Para a quantificação uma curva de
138 calibração foi feita utilizando catequina como padrão (0 a 400 mg.L⁻¹), e os resultados foram
139 expressos em miligramas equivalente de catequina por grama de amostra seca (mg EC.g⁻¹).

140 *Carotenóides:* Para quantificação do total de carotenoides foi utilizada a metodologia de
141 Rodriguez-Amaya (2001). A amostra foi adicionada de acetona gelada durante 10 minutos e
142 depois adicionada de éter de petróleo em funil de separação, lavada três vezes com água e
143 coletada a porção apolar, que foi lida em espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705)
144 à 433 nm. Uma curva de calibração utilizando padrão de β-caroteno foi obtida (10 a 50 mg.L⁻¹)
145 ¹), e os resultados foram expressos em miligramas equivalente de β-caroteno por grama de
146 amostra seca (mg Eβ.g⁻¹).

147 *Clorofilas:* Para a determinação do total de clorofilas e de clorofilas “a” e “b”, foi utilizada a
148 metodologia de (Harmut e Lichtenthaler, 1987), a extração foi realizada utilizando acetona 80%
149 e centrifugação à 1050xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado e leitura executada

a 647 e 663 nm em espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705). Para quantificação foram utilizadas as equações 1, 2 e 3, e os resultados foram expressos em miligramas por grama de amostra seca (mg.g^{-1}):

$$\text{Clorofila "a"} = (12,25 \times A_{663}) - (2,79 \times A_{647}) \text{ (eq.1)}$$

$$\text{Clorofila "b"} = (21,5 \times A_{663}) - (5,1 \times A_{647}) \text{ (eq.2)}$$

$$\text{Clorofilas totais} = (7,15 \times A_{663}) + (18,71 \times A_{647}) \text{ (eq.3)}$$

Fenólicos individuais: A extração foi realizada segundo metodologia de De Vos et al. (2007), com adaptações, pesou-se 100 mg de folhas de oliveiras, às quais foram adicionadas 990 μL de metanol grau HPLC 90% acidificado com 0,1% de ácido fórmico e 10 μL de reserpina (1 mg.mL^{-1}) como padrão interno. A mistura foi colocada em banho ultra-sônico por 15 minutos à 25°C , e centrifugada à $14500 \times g$ por 10 minutos à 4°C . O sobrenadante foi separado e adicionado de mais 1 mL de metanol HPLC 90% acidificado com 0,1% de ácido fórmico, repetindo as etapas de extração, e juntado ao sobrenadante anterior. O extrato foi filtrado em filtros de nylon com poro de $0,22 \mu\text{m}$ e injetado em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.

A separação dos compostos foi realizada através de um cromatógrafo líquido (UFLC, Shimadzu, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada a coluna Luna C18 ($75 \times 2 \text{ mm}$). As fases móveis foram: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila (eluente B). O gradiente usado foi (min:%B): (0:10); (2:10); (10:75); (15:75); (18:90); (21:90); (23:10) e (30:10). O fluxo da fase móvel foi de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C . O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200. Os parâmetros de aquisição foram: voltagem

do capilar em 4 kV, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, gás de secagem em 8 mL min⁻¹, temperatura da fonte de 180°C, colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo toda a faixa de aquisição (de m/z 50 até 1200). Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue: m/z 100 , 15 eV ; m/z 500 , 35 eV ; m/z 1000, 50 eV, sendo o nitrogênio utilizado como gás de colisão. Os compostos fenólicos foram quantificados com base em curvas padrões de apigenina (39 a 2500 ng.mL⁻¹), ácido hidroxibenzóico, campferol, luteolina, oleuropeína, quercetina, rutina e tirosol. E os resultados expressos em microgramas equivalente dos padrões por grama de amostra seca (µg.g⁻¹).

185

186 **Ensaio de potencial antioxidante**

O potencial antioxidante da amostra foi determinado através do extrato metanólico utilizando três métodos. Para todos os métodos foram realizadas curvas de calibração (0 a 300 mg.L⁻¹) utilizando como padrão de referência o Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), e os resultados foram expressos em milimol de Trolox por grama de amostra seca (mmol Trolox.g⁻¹).

O sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi determinado utilizando metodologia de Brand-Williams (1995), sendo o extrato misturado com uma solução de DPPH com absorvância conhecida, e após 100 minutos de reação foi realizada a leitura à 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705).

A capacidade redutora de ferro (FRAP) foi determinada através da reação do extrato com a solução de FRAP, a qual foi obtida com tampão acetato, TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) e cloreto férrico. A reação ocorreu em banho termostático à 30°C durante 30 minutos, e a leitura

foi realizada à 595 nm em espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705) (Da Silva et al., 2013).

A remoção do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) foi determinada pela reação do extrato com a solução de ABTS, a qual foi obtida com ABTS e persulfato de potássio, deixada em repouso por 16 horas antes da análise. A duração da reação foi de 6 minutos e a leitura foi realizada a 734 nm em espectrofotômetro UV-VIS (modelo JENWAY 6705) (Gülçin et al., 2010).

Análises estatísticas

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de 3 cultivares e 4 épocas de coleta. Para análise dos dados foram realizadas as médias e respectivos desvios padrões, assim como a análise de variância. Para as variáveis que apresentaram significância foi realizado teste de *Scott-Knott* considerando 5% de significância. Também foi realizada a análise de correlação simples entre variáveis ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Pelos resultados obtidos durante o experimento observou-se que para o total de compostos fenólicos, flavonoides e de taninos hidrolisáveis nas folhas, não há interação entre as cultivares e as estações do ano. Desta forma a estatística das variáveis separadas demonstraram que folhas da cultivar Manzanilla apresentam maiores teores de compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis (Tabela 1).

Os compostos fenólicos são oriundos do metabolismo especializado das plantas e estão relacionados com a defesa dela frente às condições adversas durante a vida. Trabalhos demonstram que diferentes cultivares apresentam produção diferenciada de compostos bioativos, como de compostos fenólicos (Stinco et al., 2015).

224 Quando avaliados somente as estações do ano e sua contribuição para o aumento de
225 determinados compostos bioativos, percebeu-se que no inverno ocorreu a menor síntese de
226 compostos fenólicos e no verão foi a maior síntese. Assim, foi observado que as altas
227 temperaturas podem resultar na ativação de mecanismos de proteção da oliveira, e como
228 consequência induzir maior síntese destes compostos. Em estudo realizado por Martinez et al.
229 (2016) foi observada a influência do estresse salino e térmico em folhas de tomate, sendo
230 observado que para a família dos flavonoides como a quercetina e o campferol, o estresse
231 térmico tem uma grande influência, fazendo com que o conteúdo de alguns destes compostos
232 sejam elevados em mais de 100% com o aumento da temperatura.

233 No presente estudo, os teores totais de flavonoides apresentaram médias iguais entre
234 outono/verão e inverno/primavera, enquanto que os teores de taninos hidrolisáveis
235 apresentaram médias iguais entre outono/inverno e primavera/verão; sugerindo assim, que as
236 mudanças entre as estações e por consequência nas temperaturas diárias, influenciam no
237 metabolismo das plantas de formas diferentes para cada classe de compostos presentes nas
238 folhas. Estes dados ainda não foram relatados em folhas de oliveira, contudo, conforme
239 observado por Martinez et al. (2016), o estresse térmico aplicado a plantas de tomate
240 incrementou o conteúdo flavonoides, contudo foi observada redução no conteúdo de ácido
241 cafeoilquínico com a aplicação do tratamento térmico e aumento de conteúdo com a aplicação
242 da salinidade.

243 Também não foi observada interação significativa para os potenciais antioxidantes das folhas
244 de oliveira coletadas nas diferentes estações de ano e das diferentes cultivares na análise de
245 variância (Tabela 2). Foi observado que nos três métodos testados, o extrato das folhas que
246 apresentou maior atividade antioxidante foi da cultivar Manzanilla, comportamento também
247 observado para o conteúdo de compostos bioativos. A análise de correlação demonstrou que
248 ocorreu uma alta correlação entre os potenciais antioxidantes e o conteúdo de compostos

249 fenólicos ($r=0.8989$; 0.907 e 0.8638). Segundo Talhaoui et al. (2014), quando avaliaram a
250 correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos de folhas de oliveira e o potencial
251 antioxidante medido pelo método de sequestro do radical DPPH, encontraram um alto grau de
252 correlação entre a eliminação do radical e o conteúdo de compostos fenólicos ($r=-0,9525$).

253 De maneira geral o conteúdo dos compostos mais polares não apresentou interação, assim como
254 os potenciais antioxidantes, já que estes potenciais foram testados com os extratos polares. No
255 entanto, os conteúdos de compostos mais apolares, como de clorofilas e de carotenoides (Tabela
256 3), foram variáveis analisadas que apresentaram interação significativa entre cultivar e estação,
257 indicando que estes compostos se comportam de maneiras diferentes entre cada estação do ano
258 para cada cultivar.

259 Para o total de clorofilas, clorofila “a” e “b”, as folhas da cultivar Arbequina apresentaram
260 maiores teores no outono, enquanto que as folhas das cultivares Manzanilla e Picual
261 apresentaram os maiores teores no verão. As folhas da cultivar Manzanilla apresentaram os
262 maiores teores somente no verão, enquanto que no outono, primavera e inverno, o conteúdo na
263 cultivar Arbequina foi estatisticamente superior das outras cultivares.

264 Para os teores de carotenoides, as folhas da cultivar Arbequina não apresentaram diferença de
265 conteúdo entre as estações, visto que esta cultivar é a mais adaptada para a região de cultivo.
266 Isto demonstra que as oscilações de temperatura e de radiação solar não influenciaram nestes
267 compostos nas folhas desta cultivar. Contudo, sugerem-se mais estudos para certificar este
268 resultado, visto que estudo realizado por León-Chan et al. (2017) demonstrou que o aumento
269 da radiação UV-B em plantas de pimentão induziu no aumento do conteúdo de carotenoides.

270 Para as outras duas cultivares, o verão foi a época em que houve maior síntese de carotenoides,
271 o que é explicado pela maior incidência solar observada no período, corroborando com
272 resultados de trabalhos citados anteriormente.

Nas estações mais frias, as folhas da cultivar Arbequina se sobressaíram quanto ao conteúdo total de carotenoides, enquanto que nas estações mais quentes não foi observada diferença entre o conteúdo das folhas das três cultivares. Assim, observa-se que as cultivares menos adaptadas ao calor da região necessitaram direcionar seu metabolismo para a produção de compostos de proteção contra a radiação UV, o que contrasta com os maiores teores dos compostos polares, como discutido anteriormente.

A análise de fenólicos individuais apresentou interação significativa entre cultivares e estações do ano (Tabela 4), sendo possível constatar que as estações do ano exercem uma forte influência no conteúdo dos compostos bioativos, sendo observado conteúdos superiores para a maioria dos compostos nas folhas (apigenina, ácido hidroxibenzóico, campferol, luteolina, quercetina e tirosol) no verão. É evidente que o verão foi a estação que mais provocou alteração nas plantas, e que estas mudanças, principalmente no aumento do conteúdo de compostos bioativos, podem estar relacionadas a maior incidência de luz/UV-B e ao aumento de temperatura. Este efeito já foi evidenciado por autores que avaliaram o perfil de bioativos de folhas de mirtilo (Jaakola et al., 2004; Brahmi et al., 2013; Liu et al., 2014b).

Quanto aos teores dos compostos bioativos investigados, percebeu-se que as folhas da cultivar Manzanilla, em praticamente todas as estações do ano (outono, inverno e primavera), apresentaram maiores quantidades de apigenina, ácido hidroxibenzóico e tirosol. O mesmo foi observado para as folhas da cultivar Arbequina quanto aos teores de campferol e luteolina. Os maiores conteúdos de oleuropeína e de rutina foram observados em todas as estações nas folhas da cultivar Picual. Outros trabalhos já demonstraram que o perfil metabólico varia entre espécies e localização geográfica (Hoffmann et al., 2017), assim como em diferentes cultivares (Brahmi et al., 2013).

Conclusões

As folhas da cultivar Manzanilla apresentaram maior potencial antioxidante e maior conteúdo de compostos fenólicos, sendo os compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira demonstraram ser os responsáveis pelas suas capacidades antioxidantes.

As diferentes estações do ano exercem influencia (positiva ou negativa) no metabolismo das oliveiras, que dependendo da cultivar, levaram aos aumentos ou reduções da síntese de compostos fenólicos, de carotenoides e de flavonoides. De maneira geral no verão foram encontrados os maiores teores para todos os compostos avaliados.

Cada cultivar de oliveira apresentou uma resposta diferente aos fatores climáticos, além de um metabolismo próprio, resultados estes importantes para as indústrias de interesse para otimizar seus processos. Na Arbequina foram encontrados os maiores teores de carotenoides nas estações frias, Manzanilla apresentou maiores teores de compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis e a Picual valores intermediários dos compostos avaliados.

Referências

BRAHMI, Faten et al. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial crops and products*, v. 49, p. 256-264, 2013.

BRAHMI, Faten et al. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*, v. 38, p. 146-152, 2012.

BRUNE, Mats et al. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 1, p. 128-131, 1991.

CEVALLOS-CEVALLOS, Juan M. et al. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, n. 11, p. 557-566, 2009.

323 DE VOS, Ric CH et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography
 324 coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*, v. 2, n. 4, p. 778-791, 2007.

325 FACUNDO, Heliofabia Virginia De Vasconcelos et al. Storage at low temperature
 326 differentially affects the colour and carotenoid composition of two cultivars of banana. *Food*
 327 *chemistry*, v. 170, p. 102-109, 2015.

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

330 GOVARIS, A. et al. Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid
 331 oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *South African Journal of Animal Science*,
 332 v. 40, n. 2, p. 0-0, 2010.

333 HARMUT, A.; LICHTENTHALER, K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of
 334 photosynthetic membranes. *Method Enzymol*, v. 148, p. 350-383, 1987.

335 HERRERO, Miguel et al. New possibilities for the valorization of olive oil by-products.
 336 *Journal of chromatography*, v. 1218, n. 42, p. 7511-7520, 2011.

337 HOFFMANN, Jessica Fernanda et al. Butia spp.(Arecaceae) LC-MS-based metabolomics for
 338 species and geographical origin discrimination. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.
 339 65, n. 2, p. 523-532, 2017.

340 *International Olive Council (IOC)*. 2017. World Olive Oil Figures. Acesso em: 18 de janeiro
 341 de 2018. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>.

342 JAAKOLA, Laura et al. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry
 343 (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, v. 218, n. 5, p. 721-728, 2004.

344 LE GALL, Hyacinthe et al. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, v. 4, n.
 345 1, p. 112-166, 2015.

346 LEÓN-CHAN, Rubén G. et al. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll
 347 content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell

348 pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany*, v. 139, p. 143-
349 151, 2017.

350 LIU, Pengzhan et al. Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium*
351 *myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Journal of agricultural and food*
352 *chemistry*, v. 62, n. 49, p. 12015-12026, 2014.

353 MARTINEZ, Vicente et al. Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors
354 oxidative damage protection under abiotic stress. *Frontiers in plant science*, v. 7, 2016.

355 NAKABAYASHI, Ryo; SAITO, Kazuki. Integrated metabolomics for abiotic stress responses
356 in plants. *Current opinion in plant biology*, v. 24, p. 10-16, 2015.

357 PRICE, Martin L.; VAN SCOYOC, Steve; BUTLER, Larry G. A critical evaluation of the
358 vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food*
359 *Chemistry*, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.

360 RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. et al. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington,
361 DC: ILSI press, 2001.

362 SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with
363 phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*,
364 v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

365 STINCO, Carla M. et al. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different
366 fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based
367 (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 37, p. 1-10,
368 2015.

369 TALHAOU, Nassima et al. Determination of phenolic compounds of ‘Sikitita’ olive leaves by
370 HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive leaves.
371 *LWT-Food Science and Technology*, v. 58, n. 1, p. 28-34, 2014.

372 TALHAOUI, Nassima et al. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination,
373 biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, v. 77, p. 92-108,
374 2015.

375 TSIMIDOU, Maria Z.; PAPOTI, Vassiliki T. Bioactive ingredients in olive leaves. In: *Olives*
376 *and olive oil in health and disease prevention*. 2010. p. 349-356.

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

Tabelas do artigo

Tabela 1. Variação na composição bioativa das folhas das variáveis que não apresentaram interação entre cultivar e estação do ano, safra 2016/17

Cultivares (média anual)				
	Compostos Fenólicos ¹	Flavonoides ²	Taninos Hidrolisáveis ³	Taninos Condensados
Arbequina	8.25 ^{B*}	5.25 ^A	29.04 ^B	ND ^{**}
Manzanilla	10.05 ^A	5.56 ^A	30.59 ^A	ND
Picual	8.45 ^B	3.94 ^B	26.09 ^C	ND
Estações (média das cultivares)				
Outono	8.59 ^B	5.13 ^A	26.60 ^B	ND
Inverno	7.61 ^C	4.19 ^B	25.23 ^B	ND
Primavera	9.08 ^B	4.42 ^B	29.15 ^A	ND
Verão	10.40 ^A	5.94 ^A	33.33 ^A	ND
CV (%):	6.71	17.43	5.75	-

*Letras maiúsculas iguais entre médias na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott considerando 5% de significância; **Não detectado; ¹(mg EAG.g⁻¹); ²(mg EQ.g⁻¹); ³(mg EAG.g⁻¹)

Tabela 2. Potencial antioxidante das folhas de oliveiras de diferentes cultivares e estações do ano, safra 2016/17 (mmol Trolox.g⁻¹)

Cultivares (média anual)			
	DPPH	FRAP	ABTS
Arbequina	65.17 ^{C*}	59.84 ^C	65.50 ^C
Manzanilla	93.53 ^A	80.86 ^A	84.79 ^A
Picual	72.04 ^B	66.48 ^B	71.99 ^B
Estações do ano (média das cultivares)			
Outono	71.88 ^C	68.28 ^B	72.20 ^B
Inverno	59.82 ^D	57.80 ^C	67.01 ^C
Primavera	84.29 ^B	68.42 ^B	73.11 ^B
Verão	91.66 ^A	81.75 ^A	84.06 ^A
CV (%):	8.1	6.05	5.09

*Letras maiúsculas iguais entre médias na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott considerando 5% de significância.

Tabela 3. Variação na composição bioativa para variáveis que apresentaram interação estatística entre cultivar e estação do ano, safra 2016/17

Clorofila A (mg.g ⁻¹)				
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Arbequina	1.03 ^{aA*}	0.78 ^{bA}	0.80 ^{bA}	0.78 ^{bB}
Manzanilla	0.81 ^{bB}	0.61 ^{cB}	0.85 ^{bA}	1.09 ^{aA}
Picual	0.64 ^{bC}	0.49 ^{cB}	0.64 ^{bB}	0.83 ^{aB}
Clorofila B (mg.g ⁻¹)				
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Arbequina	0.50 ^{aA}	0.36 ^{bA}	0.34 ^{bA}	0.29 ^{bB}
Manzanilla	0.34 ^{bB}	0.27 ^{cB}	0.36 ^{bA}	0.45 ^{aA}
Picual	0.25 ^{bC}	0.21 ^{bB}	0.25 ^{bB}	0.31 ^{aB}
Clorofila Total (mg.g ⁻¹)				
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Arbequina	2.09 ^{aA}	1.65 ^{bA}	1.79 ^{bA}	1.64 ^{bB}
Manzanilla	1.78 ^{bB}	1.41 ^{cB}	1.73 ^{bA}	2.23 ^{aA}
Picual	1.44 ^{bC}	1.19 ^{bB}	1.34 ^{bB}	1.81 ^{aB}
Carotenoides (mg Eβ.g ⁻¹)				
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Arbequina	14.20 ^{aA}	13.31 ^{aA}	12.24 ^{aA}	12.94 ^{aA}
Manzanilla	11.82 ^{bB}	9.59 ^{cB}	11.98 ^{bA}	14.18 ^{aA}
Picual	10.43 ^{bB}	8.19 ^{cB}	9.70 ^{bB}	12.22 ^{aA}

*Letras minúsculas iguais entre médias na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* considerando 5% de significância; CV (%) para clorofila A, B e Total de 10,16; 12,52 e 8,12 e carotenoides de 9,00

429 **Tabela 4.** Fenólicos individuais das folhas de oliveiras de três cultivares e quatro épocas de coleta ($\mu\text{g.g}^{-1}$), safra 2016/17

	Outono			Inverno			Primavera			Verão		
	Arbequina	Manzanilla	Picual	Arbequina	Manzanilla	Picual	Arbequina	Manzanilla	Picual	Arbequina	Manzanilla	Picual
Apigenina	83.75 ^{bB*}	156.44 ^{aA}	87.34 ^{bB}	111.99 ^{bA}	168.89 ^{aA}	71.57 ^{cC}	71.62 ^{bC}	110.68 ^{aB}	38.04 ^{cD}	87.46 ^{cB}	163.91 ^{aA}	98.63 ^{bA}
Ác. hidrox.	1.81 ^{cD}	17.42 ^{aA}	13.73 ^{bA}	4.26 ^{cC}	11.4 ^{aC}	6.18 ^{bC}	6.18 ^{cB}	13.15 ^{aB}	10.91 ^{bB}	8.16 ^{bA}	3.92 ^{cD}	12.54 ^{aA}
Campferol	2181.40 ^{aB}	774.93 ^{cC}	1500.32 ^{bB}	1864.88 ^{aB}	769.7 ^{cC}	1462.92 ^{bB}	2032.38 ^{aB}	1343.29 ^{bB}	859.91 ^{cC}	4566.06 ^{bA}	4889.17 ^{aA}	3597.35 ^{cA}
Luteolina	48.94 ^{aB}	16.54 ^{cC}	25.86 ^{bB}	43.41 ^{aB}	15.09 ^{cC}	31.97 ^{bB}	44.35 ^{aB}	30.17 ^{bB}	15.20 ^{cC}	92.01 ^{bA}	117.79 ^{aA}	90.14 ^{bA}
Oleuropeína	0.0 ^{cA}	0.09 ^{bA}	0.11 ^{aA}	0.03 ^{bA}	0.07 ^{aB}	0.07 ^{aB}	0.03 ^{bA}	0.03 ^{bD}	0.06 ^{aC}	0.04 ^{bA}	0.04 ^{bC}	0.05 ^{aC}
Quercetina	3.51 ^{bB}	3.68 ^{bB}	4.11 ^{aB}	3.57 ^{aB}	2.79 ^{bC}	2.53 ^{bC}	3.18 ^{aB}	3.41 ^{aB}	2.09 ^{bD}	4.21 ^{bA}	4.39 ^{bA}	5.40 ^{aA}
Rutina	1804.03 ^{bB}	2053.64 ^{bA}	2898.33 ^{aB}	1205.23 ^{cC}	1930.32 ^{bA}	3707.94 ^{aA}	2716.96 ^{bA}	847.2 ^{cC}	3384.25 ^{aA}	1427.29 ^{aC}	1217.29 ^{aB}	1646.23 ^{aC}
Tirosol	6.43 ^{cC}	13.11 ^{aA}	10.82 ^{bA}	7.40 ^{bB}	9.94 ^{aC}	7.36 ^{bC}	9.20 ^{bA}	12.20 ^{aB}	9.70 ^{bB}	4.55 ^{cD}	7.99 ^{bD}	11.29 ^{aA}

430 *Médias seguidas de letras minúsculas iguais entre cultivares em uma mesma época de coleta e maiúsculas entre épocas de coleta em uma mesma
431 cultivar não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott-Knott* considerando 5% de significância. CV (%) para apigenina, ác. hidrox.,
432 campferol, luteolina, oleuropeína, quercetina, rutina e tirosol, respectivamente de, 6,12; 9,91; 7,54; 9,50; 13,26; 9,62; 9,76 e 3,84.

4 Considerações finais

O conteúdo de compostos polares e apolares se comportaram de maneira diferente nas folhas de oliveira, enquanto que o conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis apresentaram um comportamento semelhante em todas as cultivares e estações de coleta, isso não foi observado para o conteúdo de compostos mais apolares, como carotenoides e clorofilas.

As folhas da cultivar Manzanilla apresentaram maior potencial antioxidante e maior conteúdo de compostos fenólicos. Foi observado maiores teores de compostos fenólicos e potenciais antioxidantes nas folhas colhidas no verão. Os compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira demonstraram ser os principais responsáveis pelas suas capacidades antioxidantes, contudo aconselha-se avaliar o potencial dos compostos apolares presentes nas folhas, como os carotenoides.

As diferentes estações do ano exercem influência (positiva ou negativa) no metabolismo das oliveiras, que dependendo da cultivar, levaram aos aumentos ou reduções da síntese de compostos fenólicos, de carotenoides e de flavonoides. De maneira geral no verão foram encontrados os maiores teores para todos os compostos avaliados.

Cada cultivar de oliveira apresentou uma resposta diferente aos fatores climáticos, além de um metabolismo próprio, resultados estes importantes para as indústrias de interesse para otimizar seus processos. Na Arbequina foram encontrados os maiores teores de carotenoides nas estações frias, Manzanilla apresentou maiores teores de compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis e a Picual valores intermediários dos compostos avaliados.

A cultivar que se destacou em termos de conteúdo de compostos bioativos, foi a única avaliada no estudo que tem finalidade para produção de azeitonas de mesa (Manzanilla). Sugerem-se estudos futuros avaliando um número maior de cultivares produzidas na região, para identificar se esta característica está presente em todas as cultivares com a mesma finalidade de utilização do fruto.

5 Referências bibliográficas

AHMAD-QASEM, M. H. et al. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 189-196, 2013.

ALAGNA, F. et al. Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropeína biosynthesis in olive (*Olea europaea* L) fruits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5542-5554, 2016.

ALAGNA, F. et al. Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. **BMC plant biology**, v. 12, n. 1, p. 162, 2012.

AL-AZZAWIE, H. F. et al. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropeína in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v. 78, n. 12, p. 1371-1377, 2006.

ALTAYLI, E. et al. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **UPB Science Bulletin**, Series B, v. 74, n. 2, p. 1454-2331, 2012.

ALTIOK, E. et al. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 2, p. 342-348, 2008.

AMIOT, M. J. et al. Accumulation of oleuropeína derivatives during olive maturation. **Phytochemistry**, v. 28, n. 1, p. 67-69, 1989.

AMOAH, B. P. et al. Immunopathogenesis of myocarditis: the interplay between cardiac fibroblast cells, dendritic cells, macrophages and CD4+ T cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2015.

ANDREADOU, I. et al. The olive constituent oleuropeína exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. **The journal of nutrition**, v. 136, n. 8, p. 2213-2219, 2006.

ANDRIKOPOULOS, N. et al. Oleuropeína inhibits LDL oxidation induce by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. **LWT-Food Science and Technology**, v. 35, n. 6, p. 479-484, 2002.

ANSARI, M. et al., Development of a Simple Green Extraction Procedure and HPLC Method for Determination of Oleuropein in Olive Leaf Extract Applied to a Multi-Source Comparative Study. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 8, p. 38-47, 2011.

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

ARANHA, B. C. **Análise metabolômica não-direcionada de pimentas (*Capsicum* spp.) por CG-EM**. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e

Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

ARSLAN, D. et al. Variations of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of Sariulak olive oil as induced by growing area. **Food research international**, v. 54, n. 2, p. 1897-1906, 2013.

BARRAJÓN-CATALÁN, E. et al. Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 105, p. 156-162, 2015.

BARRANCO, D. et al. Frost tolerance of eight olive cultivars. **HortScience**, v. 40, n. 3, p. 558-560, 2005.

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

BERTONCINI, E. I. et al. **Desafios para produção de azeite no Brasil**. Campinas: Infobibos, 2010.

BHARATHY, H.; FATHIMA, N. Nishad. Exploiting oleuropein for inhibiting collagen fibril formation. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 179-186, 2017.

BISIGNANO, G. et al. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropeína and hidroxitirosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 8, p. 971-974, 1999.

BOEIRA, V. T. et al. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 384, n. 3, p. 265, 2011.

BOUALLAGUI, Z. et al. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 1, p. 179-184, 2011.

BOUAZIZ, M. et al. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 253-262, 2008.

BOUAZIZ, M. et al. Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves. **European journal of lipid science and technology**, v. 112, n. 8, p. 894-905, 2010.

BRAHMI, F. et al. Chemical composition and biological activities of volatile fractions from three Tunisian cultivars of olive leaves. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 10, p. 2863-2872, 2012b.

BRAHMI, F. et al. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 146-152, 2012a.

BRAHMI, F. et al. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. **Industrial crops and products**, v. 49, p. 256-264, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRETON, C. M. et al. Origin and history of the olive. In: **Olive Germplasm-The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy**. InTech, 2012.

BRIANTE, R. et al. Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropeína hydrolysis by hyperthermophilic β -glycosidase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3198-3203, 2001.

BRUNE, M. et al. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 128-131, 1991.

BULOTTA, S. et al. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. **Journal of molecular endocrinology**, v. 51, n. 1, p. 181-189, 2013.

BULOTTA, S. et al. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 219, 2014.

CALIS, I. et al. Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1453-1456, 1993.

CAPECKA, E. et al. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food chemistry**, v. 93, n. 2, p. 223-226, 2005.

CAPPELLARO, T. H. et al. Cultivares. In: COUTINHO, E. F. et al. **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. p. 41-48.

CARRERA-GONZÁLEZ, M. P. et al. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. **Trends in food science & technology**, v. 31, n. 2, p. 92-99, 2013.

CASTRO, H. G. de et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2ª edição. Visconde do Rio Branco: Suprema. 113 p. 2004.

CAVALHEIRO, C. V. et al. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, 2014.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. et al. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 11-12, p. 557-566, 2009.

CHEN, Y.-C. et al. Six peptide wound signals derived from a single precursor protein in Ipomoea batatas leaves activate the expression of the defense gene sporamin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11469-11476, 2008.

CHRISTIA, P. et al. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. **European journal of clinical investigation**. v. 43, n. 9, p. 986-995, 2013.

CICERALE, S. et al. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 129-135, 2012.

COUTINHO, E. F. et al. Introdução e importância econômica. In: COUTINHO, E. F. et al. **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. p. 17-20.

CUMAUGLU, A. et al. Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β -cells. **Acta Biochim. Pol**, v. 58, p. 45-50, 2011.

DA SILVA, E. C. C. et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 1-6, 2013.

DAMTOFT, S. et al. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1291-1299, 1993.

DE LEONARDIS, A. et al. Evidence of oleuropeína degradation by olive leaf protein extract. **Food chemistry**, v. 175, p. 568-574, 2015.

DE VOS, R. C. H. et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 778, 2007.

DEKANSKI, D. et al. Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1137-1143, 2011.

DO AMARAL, A. M. et al. Plataformas tecnológicas no estudo da bactéria causadora do cancro cítrico: genômica, transcriptômica e proteômica. **Melhoramento e biotecnologia**, v. 27, p. 17, 2006.

DOUPIS, G. et al. Water relations, physiological behavior and antioxidant defence mechanism of olive plants subjected to different irrigation regimes. **Scientia Horticulturae**, v. 153, p. 150-156, 2013.

ERBAY, Z.; ICIER, F. The importance and potential uses of olive leaves. **Food Reviews International**, v. 26, n. 4, p. 319-334, 2010.

ESCRICHE, I. et al. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food chemistry**, v. 142, p. 135-143, 2014.

ESMAILIDEHAJ, M. et al. Effect of oleuropein on myocardial dysfunction and oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury in isolated rat heart. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 7, n. 4, p. 224-230, 2016.

FACUNDO, H. V. de V. et al. Storage at low temperature differentially affects the colour and carotenoid composition of two cultivars of banana. **Food chemistry**, v. 170, p. 102-109, 2015.

FARAG, R. S. et al. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. **International journal of food science & technology**, v. 38, n. 1, p. 81-87, 2003.

FARAG, R. S. et al. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. **International journal of food science & technology**, v. 42, n. 1, p. 107-115, 2007.

FARES, R. et al. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese Olea europaea extract. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 58-63, 2011

FARINELLI, D. et al. Intensity and growth period of the fruit components of olive varieties. **Acta Horticulturae**, v. 568, p. 607–610, 2002.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. et al. An approach to nitrogen balance in olive orchards. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 219-226, 2012.

FRAIGE, K. et al. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 395-403, 2014.

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

GEYIKOGLU, F. et al. Effect of oleuropeína against chemotherapy drug-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damages in rat kidney injury. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 2, p. 447-459, 2017.

GINER, E, et al. Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1113-1120, 2013.

GONÇALVES, P. M. F. **Efeitos de metabolitos de fenóis do azeite no dano oxidativo em eritrócitos humanos**. 2013. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade do Porto, 2013.

GOVARIS, A. et al. Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. **South African Journal of Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 0-0, 2010.

GRAWISH, M. E. et al. Inhibition of 4-NQO-induced F433 rat tongue carcinogenesis by oleuropein-rich extract. **Medical Oncology**, v. 28, n. 4, p. 1163-1168, 2011.

GROSSI, C. et al. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71702, 2013.

GUINDA, Á. et al. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 431-438, 2015.

GÜLÇİN, I. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2227-2238, 2010.

GUTIERREZ-ROSALES, F. et al. Metabolites involved in oleuropeína accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12924-12933, 2010.

HADJI SAVVAS, S. **The olive tree and olive oil in the ancient Greek world**. PIOP, Athens (in Greek). 2008.

HADRICH, F. et al. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. **Chemico-biological interactions**, v. 252, p. 54-60, 2016.

HARMUT, A.; LICHTENTHALER, K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. **Method Enzymol**, v. 148, p. 350-383, 1987.

HASSANZADEH, K. et al. The role of structural C-H compared with phenolic OH sites on the antioxidant activity of oleuropeína and its derivatives as a great non-flavonoid family of the olive components: A DFT study. **Food Chemistry**, v.164, n.1, p.251-258, 2014.

HASSEN, I. et al. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 926-940, 2015.

HERRERO, M. et al. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. **Journal of chromatography**, v. 1218, n. 42, p. 7511-7520, 2011.

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

HOFFMANN, J. F. **Abordagem metabolômica para acessar características de qualidade em frutos e produtos de *Butia* spp.** 2016. 75f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

INTERNATIONAL OIL COUNCIL (IOC). **World Olive Oil and Olive Figures**. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/130-survey-and-assessment-division>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2018.

JAAKOLA, L. et al. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. **Planta**, v. 218, n. 5, p. 721-728, 2004.

JAPÓN-LUJÁN et al. Multivariate optimisation of the microwave- assisted extraction of oleuropeína and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, n. 2, p. 185-191, 2006.

JAPÓN-LUJÁN, R. et al. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropeína and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 76-82, 2006.

JAPÓN-LUJÁN, R.; DE CASTRO, M. D. L. Liquid–liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2505-2511, 2008.

JEMAI, H. et al. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176, n. 2-3, p. 88-98, 2008a.

JEMAI, H. et al. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2630-2636, 2008b.

JENSEN, S. R et al. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 213-231, 2002.

KILLEEN, M. J. et al. NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: Exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. **Drug discovery today**, v. 19, n. 4, p. 373-378, 2014.

KIRITSAKIS, K. et al. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 4, p. 369-376, 2010.

KOEK, M. M. et al. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, n. 3, p. 307-328, 2011.

KONoz, E. et al. Chemometrics-assisted gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatile components of olive leaf oil. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 10, n. 1, p. 169-179, 2013.

KORUKLUOGLU, M. et al. Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye region of Turkey. **Annals of microbiology**, v. 56, n. 4, p. 359, 2006.

KOSTELENOS, G.; KIRITSAKIS, A. Olive tree history and evolution. In: KIRITSAKIS, A.; SHAHIDI, F. (Ed.) **Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing**. John Wiley & Sons, 2017. p. 1-12.

KRENNING, G. et al. The origin of fibroblast and mechanism of cardiac fibrosis. **Journal of cellular physiology**, v. 225, n. 3, p. 631-637, 2010.

KULMS, D. et al. NF- κ B and cytokines. **Vitamins and Hormones**. v. 74, p.283–300, 2006.

LALAS, S. et al. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1521-1525, 2011.

LE GALL, H. et al. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. **Plants**, v. 4, n. 1, p. 112-166, 2015.

LE TOUTOUR, B. et al., Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1173-1178, 1992.

LEÓN-CHAN, R. G. et al. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 139, p. 143-151, 2017.

LICHTENTHALER, H. K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. **Journal of plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 4-14, 1996.

LIU, P. et al. Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 49, p. 12015-12026, 2014b.

LIU, Y, N. et al. Olive leaf extract suppresses messenger RNA expression of proinflammatory cytokines and enhances insulin receptor substrate 1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet-induced diabetes. **Nutrition Research**, v. 34, n. 5, p. 450-457, 2014a.

LOCKYER, S. et al. Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 1, p. 75-83, 2015.

LUCCARINI, I. et al. Oleuropeína aglycone protects against pyroglutamylated-3 amyloid- β toxicity: biochemical, epigenetic and functional correlates. **Neurobiology of Aging**, v.36, n 2, p. 648-663, 2015.

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

MALHEIRO, R. et al. Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 2, p. 509-521, 2013.

MARANGONI, C. et al. Effect of incorporating olive leaves (*Olea europaea* L.) on the development and quality of poultry meat. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 173, 2015.

MARTINEZ, V. et al. Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. **Frontiers in plant science**, v. 7, 2016.

MCSWEENEY, C. S. et al. A review of anti-nutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. **Animal feed science and technology**, v. 147, n. 1-3, p. 158-171, 2008.

MEIRINHOS, J. et al. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. **Natural product research**, v. 19, n. 2, p. 189-195, 2005.

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

MONTEDORO, G. et al. Simple and hydrolysable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 2228-2234, 1993.

MORAES, J. P. et al. The ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.) reduces urinary bladder damage during cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

MYLONAKI, S. et al. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 5, p. 977, 2008.

NAKABAYASHI, R.; SAITO, K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 24, p. 10-16, 2015.

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

NOORDIN, R.; OTHMAN, N. Proteomics Technology—A Powerful tool for the biomedical scientists. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 20, n. 2, p. 1, 2013.

OBIED, H. K. et al. Pharmacology of olive biophenols. In: **Advances in molecular toxicology**. Elsevier, 2012. p. 195-242.

OGUN, W. et al. Oleuropein ameliorates arsenic induced oxidative stress in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 36, p. 1-6, 2016.

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

OLIVEIRA, D. M. D.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 543-555, 2000.

ORTEGA-GARCÍA, F et al. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropeína concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. **Tree physiology**, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2008.

ÖZCAN, M. M.; MATTHÄUS, B. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 1, p. 89-99, 2017.

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

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

PAIVA-MARTINS, F. et al. Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 10, p. 4139-4143, 2007.

PAIVA-MARTINS, F. et al. The effect of olive leaf supplementation on the constituents of blood and oxidative stability of red blood cells. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 271-279, 2014.

PASBAN-ALIABADI, H., et al. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein. **Rejuvenation research**, v. 16, n. 2, p. 134-142, 2013.

PASSARI, L. M. Z. G. **Estudos quimiométricos dos efeitos do solvente e da sazonalidade nos metabólitos secundários da *Mikania laevigata***. 2014. 128f. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2014.

PEREIRA, A. P. et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. **Molecules**, v. 12, n. 5, p. 1153-1162, 2007.

PERES, L. P. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba: ESALQ. 25 p. 2004.

PRICE, M. L. et al. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.

QUIRANTES-PINÉ, R. et al. HPLC–ESI–QTOF–MS as a Powerful Analytical Tool for Characterising Phenolic Compounds in Olive-leaf Extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 3, p. 213-223, 2013.

RAFIEI, Z. et al. Evaluation of antimicrobial activity of olive leaf extracts by ELISA method. **Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 28, n. 2, p. 280-292, 2012.

RAHMANIAN, N. et al. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, n. 2, p. 150-172, 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. et al. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, DC: ILSI press, 2001.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. et al. Composition and analysis of functional components of olive leaves. In: KIRITSAKIS, A.; SHAHIDI, F. (Ed.) **Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing**. John Wiley & Sons, 2017. p. 383-399.

ROMERO, C. et al. Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 6, p. 1725-1732, 2017.

RYAN, D. et al. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar hardy's mammoth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6716-6724, 2002.

SANGI, S. M. A. et al. Antihyperglycemic effect of thymoquinone and oleuropein, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in experimental animals. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. Suppl 2, p. S251, 2015.

SEÇME, M. et al. Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Gene**, v. 585, n. 1, p. 93-99, 2016.

SEGOVIA-BRAVO, K. et al. Browning reactions in olives: mechanism and polyphenols involved. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1380-1385, 2009.

SEGURA-CARRETERO, A. et al. Polyphenols in olive oil: the importance of phenolic compounds in the chemical composition of olive oil. In: Preedy, V. R.; Watson, R. R. (Ed.), **Olives Olive Oil Health and Disease Prevention**, Academic Press, San Diego, p.167–175, 2010.

SERVILI, M. et al. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 113-127, 2004.

SHERIF, I. A. et al. SHERIF, Iman O. et al. Uroprotective effect of oleuropein in a rat model of hemorrhagic cystitis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 74, p. 12-17, 2016.

SHI, J. et al. Oleuropein Protects Intracerebral Hemorrhage-induced Disruption of Blood-brain Barrier through Alleviation of Oxidative Stress. **Pharmacological Reports**, 2017.

SILVA, E. D. et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 1-6, 2013.

SILVA, S. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 5, p. 385-395, 2006.

SINANOGLU, O. et al. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. **Urology**, v. 80, n. 6, p. 1392. e1-1392. e6, 2012

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOFO, A. et al. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewating in olive tree. **Plant Science**, v. 166, n. 2, p. 293-302, 2004.

SOLER-RIVAS, C. et al. Oleuropeína and related compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1013-1023, 2000.

SORIANO, I. R. et al. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of chemical ecology**, v. 30, n. 10, p. 1885-1899, 2004.

STINCO, C. M. et al. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 1-10, 2015.

SUDJANA, A. N. et al. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 5, p. 461-463, 2009.

SUMIYOSHI, M.; KIMURA, Y. Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 7, p. 995-1003, 2010.

SUMNER, L. W. et al. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817-836, 2003.

SUN, W. et al. Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 556-566, 2017.

SUZUKI, N. et al. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014.

TAAMALLI, A. et al. Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS2. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 3, p. 791-798, 2012a.

TAAMALLI, A. et al. Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1817-1825, 2012b.

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

TALHAOUI, N. et al. Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. **LWT-Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 28-34, 2014.

TALHAOUI, N. et al. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. **Food Research International**, v. 77, p. 92-108, 2015.

TAN, H-W. et al. Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 1, p. 187-191, 2003.

TANAHASHI, T. et al. Two dimeric secoiridoid glucosides from *Jasminum polyanthum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1341-1345, 1996.

THERIOS, I. N. **Olives**. Wallingford, UK: CABI, 2009.

TIEDJE, C. et al. The role of mammalian MAPK signaling in regulation of cytokine mRNA stability and translation. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 34, n. 4, p. 220-232, 2014.

TOUS, J. et al. Olive orchard design and Mechanization: Present and future. **Acta Horticulturae**, v. 1057, p. 231–246, 2014.

TOUS, J. The influence of growing region and cultivar on olives and olive oil characteristics and on their functional constituents. In: KIRITSAKIS, Apostolos; SHAHIDI, Fereidoon (Ed.) **Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing**. John Wiley & Sons, 2017. p. 44-80.

TRAPP, S.; CROTEAU, R. Defensive resin biosynthesis in conifers. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 689-724, 2001.

TRIPOLI, E. et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. **Nutrition research reviews**, v.18, n.1, p. 98-112, 2005.

TSANTILI, E. et al. Botanical characteristics of olive trees: cultivation and growth conditions – defense mechanisms to various stressors and effects on olive growth and functional compounds. In: KIRITSAKIS, A.; SHAHIDI, F. (Ed.) **Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing**. John Wiley & Sons, 2017. p. 13-33.

TSIMIDOU, M. Z.; PAPOTI, V. T. Bioactive ingredients in olive leaves. In: **Olives and olive oil in health and disease prevention**. 2010. p. 349-356.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Olea europaea L. ssp. Europaea, European olive**. National Plant Data Team. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/reference?symbol=OLEUE&sort=Documentation>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2018.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VEITCH, G. E. et al. The azadirachtin story. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 49, p. 9402-9429, 2008.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass spectrometry reviews**, v. 24, n. 5, p. 613-646, 2005.

VISIOLI, F. et al. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. **Medicinal research reviews**, v. 22, n. 1, p. 65-75, 2002.

VISIOLI, F. et al. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. **Life sciences**, v. 62, n. 6, p. 541-546, 1998.

VISSERS, M. N. et al. Olive oil phenols are absorbed in humans. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 3, p. 409-417, 2002.

WAHYUNI, Y. et al. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics**, v. 9, n. 1, p. 130-144, 2013.

WAINSTEIN, J. et al. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 7, p. 605-610, 2012.

WALTER, W. M. et al. Preparation of Antimicrobial Compounds by Hydrolysis of Oleuropeína from Green Olives. **Applied Microbiology**, v.26, n.5, p.773-776, 1973.

WANG, L. et al. The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. **European journal of nutrition**, v. 47, n. 5, p. 235-243, 2008.

WANG, W. et al. Developmental expression of β -glucosidase in olive leaves. **Biologia plantarum**, v. 53, n. 1, p. 138, 2009.

XYNOS, N. et al. Development of a green extraction procedure with super subcritical fluids to procedure extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The journal of supercritical Fluids**, v. 67, p. 89-2012.

YORULMAZ, A. et al. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 5, p. 647-658, 2013.

ZAMBIAZI, R. C. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability**. 1997, 304f. Tese (Doctor of Philosophy), Foods and Nutritional Sciences Interdepartamental Program, University of Manitoba Winnipeg, Manitoba (Canadá), 1997.

ZHANG, J. Y. et al. Oleuropein prevents the development of experimental autoimmune myocarditis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 187-195, 2017.

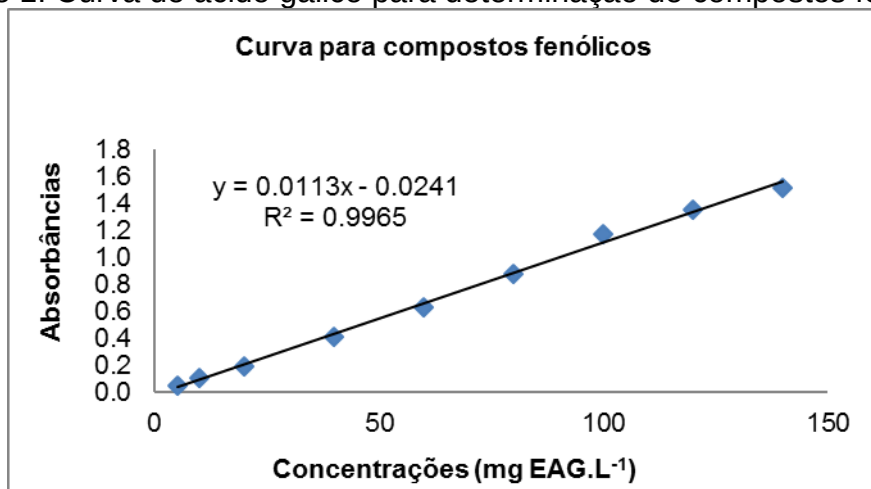
ZHAO, G. et al. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 2, p. 265-268, 2009.

ZOIDOU, E. et al. Oleuropeína as a bioactive constituent added in milk and yogurt. **Food Chemistry**. 158, p 319-324. 2014.

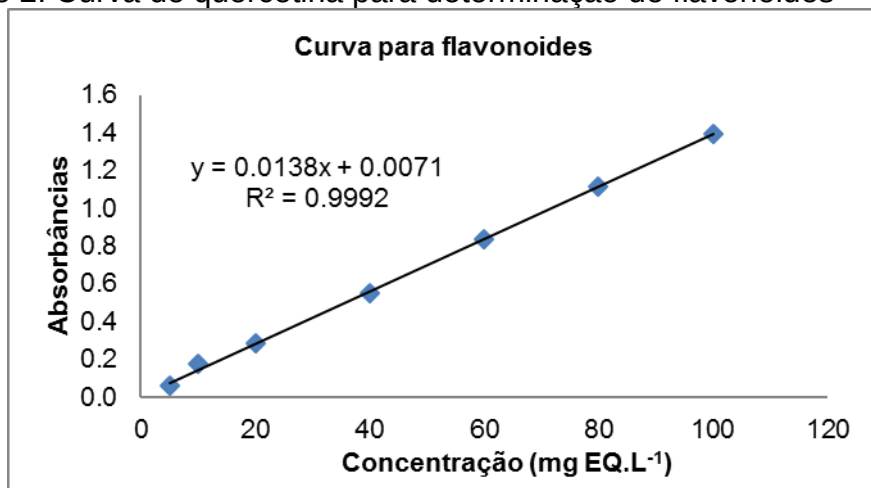
ZÖRB, C. et al. Metabolite profiling of wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from organic and conventional agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 8301-8306, 2006.

6 Apêndice

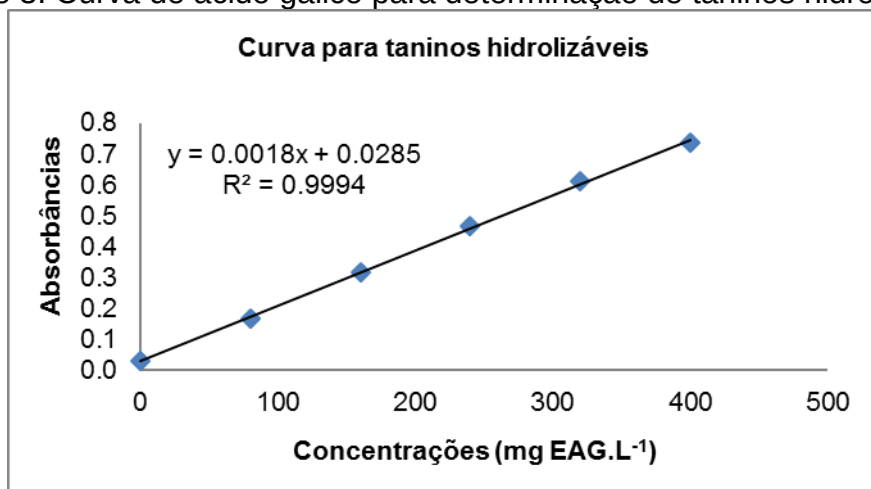
Apêndice 1. Curva de ácido gálico para determinação de compostos fenólicos



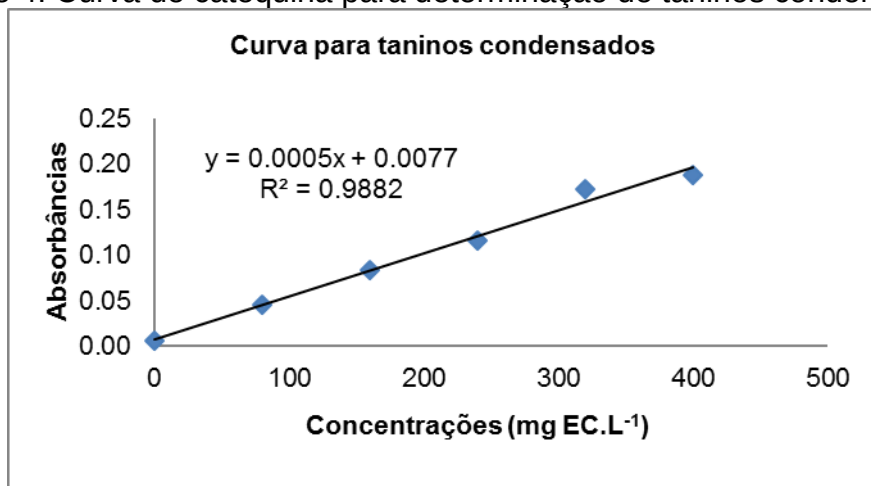
Apêndice 2. Curva de quercetina para determinação de flavonoides



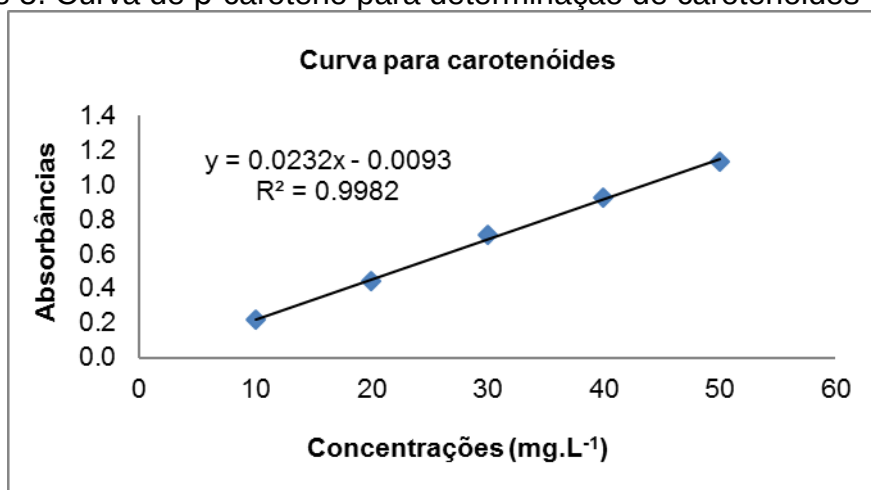
Apêndice 3. Curva de ácido gálico para determinação de taninos hidrolizáveis



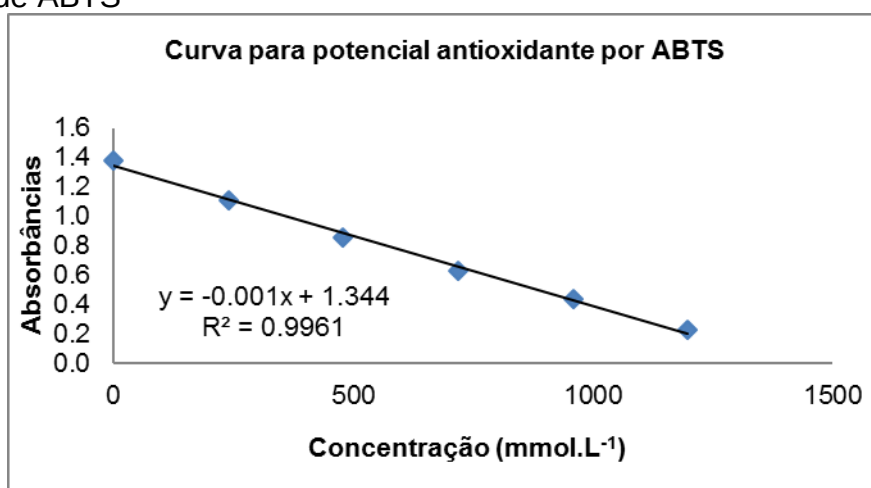
Apêndice 4. Curva de catequina para determinação de taninos condensados



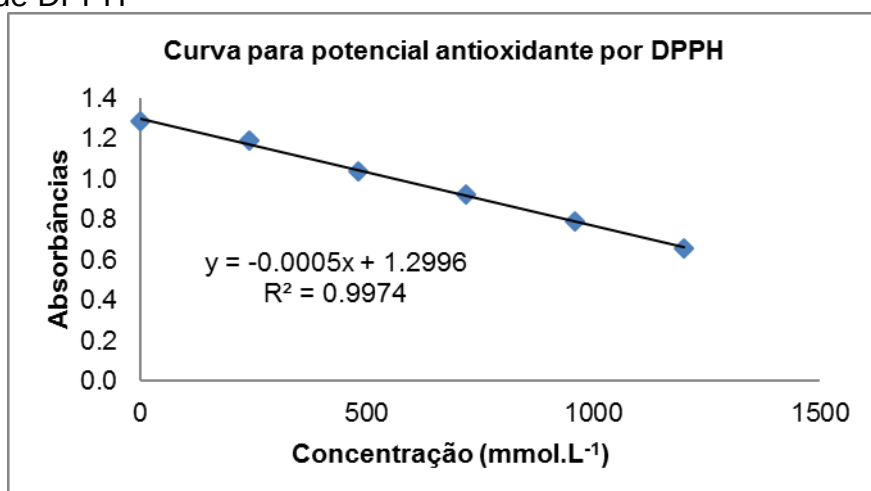
Apêndice 5. Curva de β -caroteno para determinação de carotenoides



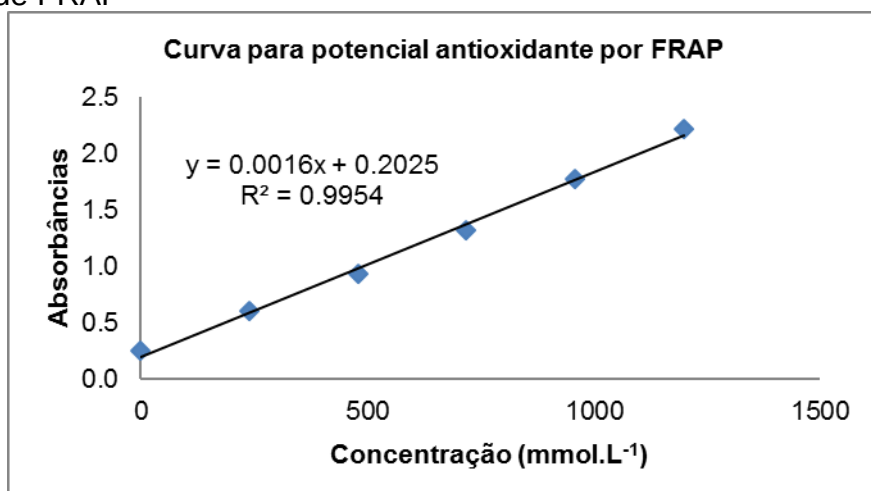
Apêndice 6. Curva de trolox para determinação do potencial antioxidante pelo método de ABTS



Apêndice 7. Curva de trolox para determinação do potencial antioxidante pelo método de DPPH



Apêndice 8. Curva de trolox para determinação do potencial antioxidante pelo método de FRAP



Apêndice 9. Tabela de correlação simples entre variáveis

	Compostos Fenólicos	Flavonoides	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total	Carotenoides	DPPH	FRAP	ABTS	Taninos Hidrolisáveis
Compostos Fenólicos	-	0.5626	0.5109	0.2973	0.554	0.324	0.8989	0.907	0.8638	0.769
Flavonoides	*	-	0.5858	0.4839	0.6303	0.4831	0.3994	0.5042	0.4612	0.5494
Clorofila A	*	*	-	0.9509	0.9818	0.7853	0.4236	0.4306	0.3306	0.6209
Clorofila B	NS	*	*	-	0.9211	0.749	0.2226	0.233	0.134	0.4509
Clorofila Total	*	*	*	*	-	0.7808	0.4124	0.4346	0.3454	0.6175
Carotenoides	NS	*	*	*	*	-	0.1889	0.2006	0.1141	0.5791
DPPH	*	*	*	NS	*	NS	-	0.9297	0.9021	0.7662
FRAP	*	*	*	NS	*	NS	*	-	0.9191	0.7276
ABTS	*	*	*	NS	*	NS	*	*	-	0.6858
Taninos Hidrolisáveis	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-

*Correlação significativa pelo teste de *Tukey* considerando 5% de significância