INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA
Escola Superior Agrária

Utilização de extratos de folhas de oliveira como agente antioxidante

Sílvia Martins Afonso

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por

Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Prof. Doutora Branca Maria Cardoso Monteiro da Silva

Bragança
2014

AGRADECIMENTOS

Pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho, gostaria de manifestar o mais sincero agradecimento:

Ao meu orientador Professor Doutor José Alberto Pereira, pela sugestão do tema de trabalho, pela orientação, permanente disponibilidade e incentivo.

À Professora Doutora Branca Silva, da Universidade da Beira Interior, pela sua disponibilidade na orientação, e pelas facilidades concedidas para a caracterização fitoquímica das folhas.

Aos meus colegas de laboratório, Anabela Sousa, Nuno Rodrigues e Ricardo Malheiro pelo auxílio, incentivo e conhecimentos transmitidos, bem como a boa disposição ao longo do trabalho.

À D. Isabel e Amélia, pelo apoio e amizade demonstrados ao longo do tempo.

À Berta, pelo "impulso" final para a escrita da tese.

À Fátima, por sempre acreditar em mim, pelo carinho e amizade e por estar sempre presente, embora longe.

A toda a minha família, pelo apoio e carinho manifestado ao longo da minha vida.

Ao Ivo, pelo amor, carinho e amizade demonstrados sempre e pelo apoio nos momentos menos bons.

E a todos os meus amigos, não mencionados, mas não esquecidos.

À minha mãe.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS vii
ÍNDICE DE QUADROS viii
RESUMO ix
ABSTRACT x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS xi
1. **INTRODUÇÃO** 3
2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 9
2.1. A Oliveira 9
2.2. A folha da oliveira 10
2.2.1. Compostos fenólicos na folha da oliveira 11
2.2.2. Atividade antioxidante dos compostos fenólicos 18
2.3. A folha da oliveira e potencial para o uso na indústria agroalimentar 20
2.4. Oxidação lipídica 20
2.4.1. Reações hidrolíticas 21
2.4.2. Oxidação enzimática 22
2.4.3. Foto-oxidação 22
2.4.4. Auto-oxidação 22
2.5. Antioxidantes e oxidação lipídica 23
2.6. Manteiga e margarina 24
3. **MATERIAIS E MÉTODOS** 29
3.1. Avaliação da atividade antioxidante de folhas de diferentes cultivares de oliveira 29
3.1.1. Amostras 29
3.1.2. Preparação dos extratos de folhas de oliveira 29
3.1.3. Atividade antioxidante 30
3.2. Influência da adição de extratos de folhas de oliveira no processo oxidativo de manteiga e margarina 32
3.2.1. Caracterização das matérias-primas 32
3.2.2. Caraterização fitoquímica das folhas de oliveira recorrendo à Ressonância Magnética Nuclear de Protão (RMN ^{1}H) 32
3.2.3. Preparação dos extratos de folhas de oliveira 33
3.2.4. Preparação das amostras de manteiga e margarina com adição de extratos de folhas de oliveira 33
3.2.5. Condições de oxidação 33

3.2.6. Determinação da cor 34
3.2.7. Atividade antioxidante 34
3.3. Análise estatística 36
3.3.1. Análise de Variância (ANOVA) 36
4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 41
4.1. Atividade antioxidante de folhas de cultivares de oliveira 41
4.1.1. Quantificação do teor em fenóis totais 42
4.1.2. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) 43
4.1.3. Determinação do Poder redutor 46
4.1.4. Caraterização fitoquímica das folhas de oliveira recorrendo à RMN ^{1}H 47
4.2. Influência da adição de extratos de folhas de oliveira no processo oxidativo 48
4.2.1. Quantificação dos fenóis totais 48
4.2.2. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) 49
4.2.3. Efeito sequestrante do radical Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfónico (ABTS•+) 52
4.3. Determinação da cor 54
5. **CONCLUSÕES** 71
6. **BIBLIOGRAFIA** 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar centenário de oliveira. 9
Figura 2 – Ácidos fenólicos presentes nas folhas de oliveira..... 13
Figura 3 – Flavonas presentes nas folhas de oliveira. 15
Figura 4 – Flavonóis e flavanonas presentes nas folhas de oliveira..... 16
Figura 5 – Secoiridóides fenólicos presentes nas folhas de oliveira. 17
Figura 6 – Álcoois fenólicos presentes nas folhas de oliveira. 18
Figura 7 – Folhas de oliveira de diferentes cultivares de oliveira: Arbequina (A), Cobrançosa (B), Galega vulgar (C) e Picual (D). 29
Figura 8 - Apresentação comercial de Manteiga dos Açores (a) e de Margarina Planta (b)..... 32
Figura 9 – Valores do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (%) obtidos para extratos de folhas de diferentes cultivares de oliveira. 44
Figura 10 – Valores de absorvância a 700 nm determinados no ensaio do poder redutor para extratos de folhas de diferentes cultivares de oliveira..... 46
Figura 11 - Espetro RMN ^{1}H do extrato de folhas da cultivar Arbequina 47
Figura 12 – Valores médios do teor em fenóis totais de manteiga (A) e margarina (B), com adição de diferentes concentrações de extrato de folha de oliveira..... 48
Figura 13 – Valores médios de efeito bloqueador de radicais de DPPH da manteiga (A) e margarina (B), com adição de diferentes concentrações de extrato de folha de oliveira.. 50
Figura 14 – Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS da manteiga (A) e margarina (B), com adição de diferentes concentrações de extrato de folha de oliveira.. 52
Figura 15 – Valores médios da variação de cor (ΔE) das amostras de manteiga com adição de extrato a diferentes concentrações: 0,1 mg/g (A), 0,25 mg/g (B), 0,5 mg/g (C) e 1 mg/g (D), relativamente ao ensaio controlo (sem adição de extrato)..... 61
Figura 16 – Valores médios de Índice de amarelecimento (YI) (B) das amostras de manteiga com adição de extrato a diferentes concentrações: 0 mg/g (A); 0,1 mg/g (B), 0,25 mg/g (C), 0,5 mg/g (D) e 1 mg/g (E) 62
Figura 17 – Valores médios da variação de cor (ΔE) das amostras de margarina com adição de extrato a diferentes concentrações: 0,1 mg/g (A), 0,25 mg/g (B), 0,5 mg/g (C) e 1 mg/g (D), relativamente ao ensaio controlo (sem adição de extrato)..... 65
Figura 18 – Valores médios de Índice de amarelecimento (YI) das amostras de margarina com adição de extrato a diferentes concentrações: 0 mg/g (A); 0,1 mg/g (B), 0,25 mg/g (C), 0,5 mg/g (D) e 1 mg/g (E) 66

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Composição nutricional de manteiga com sal e margarina (valores por 100 g de parte edível). Adaptado de Tabela da composição de alimentos – INSA, 2014. 25

Quadro 2 – Rendimentos de extração, teor em fenóis totais (mg. de equivalentes de ácido cafeico/g de extrato) e valores de EC_{50} (mg de extrato/mL) determinados nos ensaios do poder redutor e do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH de extratos de folhas de diferentes cultivares de oliveira (média±dp). 41

Quadro 3 – Valores médios dos parâmetros L, a, b e L*, a*, b* determinados na manteiga, sem e com adição de extrato de folhas de oliveira. 56

Quadro 4 – Valores médios dos parâmetros L, a, b e L*, a*, b* determinados na margarina, sem e com adição de extrato de folhas de oliveira. 58

RESUMO

No presente trabalho pretendeu-se estudar o efeito da adição de extratos de folhas de oliveira, um sub-produto existente em grandes quantidades em Portugal, à margarina e manteiga, duas matrizes com elevado teor em gordura e com elevada susceptibilidade à oxidação, ao nível do teor em fenóis totais, atividade antioxidante e cor. Para selecionar o extrato a adicionar, inicialmente procedeu-se à avaliação de extratos de diferentes variedades de oliveira (Arbequina, Cobrançosa, Galega vulgar e Picual), tendo sido selecionada a variedade Arbequina, que foi posteriormente caraterizada por Ressonância Magnética Nuclear de protão (RMN ^{1}H). O perfil fitoquímico das folhas de Arbequina indicou a presença de glucose, sacarose, oleuropeína, luteolina-4'-*O*-glucósido, luteolina, hidroxitirosol acetato, hidroxitirosol e luteolina-7-*O*-glucósido.

A adição de extrato de folha de oliveira não causou variações significativas no teor em fenóis totais quantificados na manteiga, verificando-se, por outro lado, um aumento significativo do teor em fenóis totais detetados na margarina com a adição de extrato de folha a uma concentração de 1 mg de extrato/g de amostra. Na avaliação da atividade antioxidante da manteiga e margarina, para ambos os métodos, a margarina mostrou uma forte capacidade antioxidante, relativamente à manteiga. Para o DPPH, em ambas as matrizes, verificou-se que a adição de extrato aumentou a capacidade antioxidante da manteiga e margarina, sendo que para o método ABTS, a adição de extratos resultou em comportamentos diferenciados para cada uma das amostras. Na avaliação de parâmetros de cor, e para a manteiga, foi visível um decréscimo da luminosidade com a adição de extrato, enquanto para a margarina os resultados foram variáveis, logo após a adição e ao fim de 5 e 10 dias.

Este trabalho mostrou existirem diferenças significativas na composição e atividade antioxidante nas folhas de diferentes cultivares de oliveira, confirmando, no entanto, que todas as amostras possuem um potencial uso como fontes de compostos bioactivos de interesse. Para além disso, a avaliação preliminar do uso de extratos de folhas de oliveira como agente de proteção contra a oxidação lípidica, mostrou resultados encorajadores, sendo necessário a continuação de estudos neste sentido.

Palavras-chave: Folhas de oliveira, manteiga, margarina, composição química, atividade antioxidante, oxidação lípidica, cor.

ABSTRACT

In the present work we intended to study the effect of the addition of olive leaf extracts, an abundant by-product in Portugal, to butter and margarine, two products with high fat content and highly susceptible to oxidation, regarding total phenolic content, antioxidant activity and colour. In order to select the extract to be used, a preliminary evaluation of different olive cultivars (Galega vulgar, Cobrançosa, Picual and Arbequina) was performed, with Arbequina being the selected cultivar, which was subsequently characterized by Nuclear Magnetic Ressonance (NMR^{1}H). The phytochemical profile of Arbequina leaves showed the presenc of glucose, shacarosse,

The phytochemical profile of Arbequina leaves indicated the presence of glucose, sucrose, oleuropein, luteolin-4'-*O*-glucoside, luteolin, hydroxytyrosol acetate, hydroxytyrosol and luteolin-7-*O*-glucoside.

The addition of leaf extract didn't cause significant variation regarding the total phenolic content of butter, however, a significant increase of recorded for margarine, when the extract was added at 1 mg of extract/g of sample. Regarding the antioxidant activity, in both methods, margarine showed higher antioxidant ability, comparing to butter. For DPPH, for both samples, the addition of extract increased the antioxidant activity of butter and margarine, while, for ABTS, the additon of extract resulted in different behaviours, for each of the samples.

The evaluation of color parameters, and for butter, it was visible a decrease of lightness with the addition of extract, while for margarine, the result varied, at the beginning of the assay, as well as after 5 and 10 days of oxidation.

This work showed significant differences between olive cultivars in the composition and antioxidant activity of leaves, however conforming that all samples possess a potencial as source of bioactive compounds. Furthermore, the preliminary evaluation of olive leaf extracts as protective agent against lipidic oxidation, showed encouraging results, although further studies are needed.

Key-words: olive leaves, butter, margarine, chemical composition, antioxidant activity, lipidic oxidation, colour.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a/a*- Parâmetro para cor verde ou vermelha

ABTS- Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfónico

b/b*- Parâmetro para cor amarela ou azul

Cv.- Cultivar

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EC_{50}- Concentração correspondente a 50% de inibição

INSA- Instituto Nacional de Saúde

L/L*- Parâmetro para luminosidade

nm- Nanómetro

ppm- Partes por milhão

RMN ^{1}H- Ressonância Magnética Nuclear de Protão

ROS - Espécies reativas de oxigénio

rpm- Rotações por minuto

YI- Índice de Amarelecimento

δ- Desvio químico

ΔE- Variação de Cor

λ- Comprimento de onda

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde sempre que o Homem procura na Natureza os recursos que permitam melhorar a sua condição de vida, de modo a aumentar a sua sobrevivência. Do mesmo modo, o interesse em produtos naturais, capazes de melhorar a saúde dos consumidores, tem sido a pedra basilar da abundante investigação feita no âmbito de compostos antioxidantes provenientes de plantas.

Os principais compostos presentes nas plantas com capacidade antioxidante, os fenóis, possuem diferentes efeitos na saúde humana, desde a redução do *stress* oxidativo, levando à prevenção e proteção contra diversos tipos de cancro, diabetes, doenças coronárias e degenerativas (Halliwell, 1996; Seifried et al., 2007), entre outras, que poderão ocorrer em diversos órgãos do corpo (Aruoma, 1998). Os fenóis podem ser encontrados na grande maioria das plantas, e são considerados os responsáveis pelos efeitos benéficos atribuídos ao consumo de produtos como o chocolate, o café, o chá verde e o vinho tinto (de Bock et al., 2012).

Uma das formas de explorar novas fontes deste tipo de compostos será usando subprodutos das atividades agrícolas, que se poderão tornar rentáveis ao se extrair deles compostos de interesse. Uma destas fontes poderá ser a folha da oliveira, o subproduto mais abundante da olivicultura, admitindo-se que, à entrada do lagar, entre 5% (El e Karakaya, 2009) e 10% (Herrero et al., 2011) do peso da azeitona corresponda, afinal, a folhas. A medicina tradicional atribui a estas folhas propriedades capazes de tratar diabetes (Komaki et al., 2003), arteriosclerose, gota, febre, reumatismo ou hipertensão (Benavente-Garcia et al., 2000; Meirinhos et al., 2005; Sato et al., 2007; Haloui et al., 2010). Além disso, diversos estudos *in vivo* mostraram as propriedades médicas a elas associadas. São exemplos disso, os estudos que comprovaram as propriedades anti-hipertensivas, diuréticas, anti ateroscleróticas, antioxidante e hipoglicemiante ou a capacidade de inibir a infeção e transmissão entre células do HIV-1 (Komaki et al., 2003; Lee-Huang et al., 2003; Somova et al., 2003; Kontogianni e Gerothanassis, 2012; de Bock et al., 2013).

Estas propriedades medicinais correspondentes às folhas de oliveira têm sido atribuídas à sua composição em compostos fenólicos. De facto, se olharmos para as diferentes partes da oliveira, as folhas possuem uma maior capacidade antioxidante e poder bloqueador de radicais (El e Karakaya, 2009), bem como uma maior concentração de compostos fenólicos (de Bock et al., 2013), quando comparando com as restantes

partes da árvore. Incluem-se na composição fenólica das folhas de oliveira cinco tipos de compostos: oleuropeósidos (p.e. oleuropeína), flavonas (p.e. luteolina 7-*O*-glucósido), flavonóides (p.e. rutina), flavan-3-ois (p.e. catequina) e fenóis substituídos (p.e. hidroxitirosol) (El e Karakaya, 2009), tendo sido detetados até 54 compostos diferentes (Fu et al., 2010). A composição fenólica individual varia de cultivar para cultivar (Meirinhos et al., 2005), e também têm sido detetadas diferenças na identificação e quantificação destes compostos, causadas pela variação do método de extração (Pereira et al., 2007) e época de colheita (Brahmi et al., 2013). No entanto, apesar das variações detetadas, podem-se apontar como compostos maioritários a oleuropeína (Benavente-García et al., 2000; Briante et al., 2002; Bouaziz e Sayadi, 2005; Pereira et al., 2007), luteolina 7-*O*-glucósido (Meirinhos et al., 2005; Pereira et al., 2007), hidroxitirosol (Benavente-García et al., 2000; Briante et al., 2002), e a apigenina 7-*O*-glucósido (Meirinhos et al., 2005; Pereira et al., 2007).

Devido à capacidade antioxidante reconhecida das folhas de oliveira, alguns estudos tentaram demonstrar a sua utilização como agente de proteção contra a oxidação de óleos e gorduras (Farag et al., 2003; Farag et al., 2007; Paiva-Martins et al., 2007; Salta et al., 2007; Bouaziz et al., 2008; Chiou et al., 2009). Em todos os casos, a adição de extratos de folhas revelou conferir uma resistência à oxidação dos óleos e gorduras testados.

Em Portugal, o consumo de gorduras de origem vegetal, onde se incluem os óleos vegetais, azeite e margarinas, foi cerca de 2 vezes superior, em 2012, do que o consumo gorduras animais, como a manteiga, banha e toucinho (INE, 2014). Se excluirmos o azeite e óleos vegetais, quer a manteiga, definida no nº1 do Artigo 2º, da Portaria 110/88 de 15 de Fevereiro como "o produto butiroso obtido exclusivamente do leite de vaca ou da sua nata, apresentando-se sob a forma de uma emulsão sólida e maleável ", quer a margarina, definida na alínea c), do artigo 2º, da Portaria 947/98 de 3 de Novembro como o "produto obtido a partir de gorduras e óleos vegetais e ou animais, com um teor mínimo de matérias gordas de 80% e inferior a 90%, com consistências variáveis, consoante o fim a que se destinam", são as duas gorduras mais produzidas (INE, 2011) e utilizadas tanto na alimentação como no uso culinário.

Apesar disso, são poucos os estudos focados na adição de extratos vegetais a estas gorduras e o seu efeito na oxidação, e inexistentes os referentes ao uso de folhas de oliveira como fonte de agente de proteção contra a oxidação de manteiga e margarina.

Assim, os objetivos deste trabalho consistiram, numa primeira fase na:

- Avaliação do teor em fenóis totais e atividade antioxidante de extratos de folhas de quatro cultivares de oliveira (Arbequina, Cobrançosa, Galega vulgar e Picual);

e posteriormente, numa segunda fase na:

- Determinação do perfil fitoquímico das folhas da cultivar selecionada na primeira fase;
- Avaliação do efeito protetor de extratos de folha de oliveira, na oxidação de manteiga e margarina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Oliveira

A oliveira, *Olea europaea* L. (Figura 1), pertence à família *Oleaceae* e é considerada uma das árvores mais importantes dos países mediterrâneos, ocupando cerca 8 milhões de hectares, produzindo quase 98% da colheita mundial (Proença-da-Cunha et al., 2003; Guinda et al., 2004; Tabera et al., 2004). Trata-se de uma das árvores cultivadas mais antigas, possuindo um elevado interesse tanto económico como ambiental (Guinda, 2006). Distingue-se das outras espécies frutíferas pela sua longevidade, existindo exemplares centenários e milenares, sendo considerada um símbolo de paz, de sabedoria e de glória (Soni et al., 2006). Em Portugal, a oliveira encontra-se dispersa por todo o país, sendo em Trás-os-Montes, Beira Interior, Alentejo, Ribatejo e Oeste os locais de maior predomínio (Monteiro, 1999).

Figura 1 – Exemplar centenário de oliveira.

Um dos subprodutos mais abundantes da olivicultura são as folhas da oliveira. Na indústria da produção de azeite, estas podem representar entre 5% (El e Karakaya, 2009) e 10% (Herrero et al., 2011) em peso, da azeitona que entra nos lagares, podendo também ser encontradas como produto da poda das oliveiras (Tabera et al., 2004; Ferreira et al., 2007; Bouaziz et al., 2008), tendo para os produtores um custo elevado, devido à sua remoção e eliminação (Bouaziz et al., 2008). Portanto, torna-se de grande

importância económica a valorização e utilização destes subprodutos devido ao seu baixo custo e grande acumulação nestas atividades agrícolas (Guinda, 2006).

2.2. A folha da oliveira

Botanicamente, as folhas da oliveira são persistentes, com duração entre os 2 e 3 anos. São simples, com um pequeno bico terminal e com margem inteira. O limbo apresenta forma coriácea e tem entre 3 a 9 cm de comprimento e a sua largura pode variar entre 1 a 1,8 cm. A face superior da folha possui uma cor verde acinzentada escura, onde as nervuras secundárias são aparentes, enquanto que a face inferior, de cor cinza prateada, é marcada pela presença de pequenos pelos que protegem a árvore da desidratação e, onde a nervura central é muito evidente. O pecíolo é muito curto, atingindo meio cm de comprimento. Cada cultivar possui as suas características relativamente às formas e dimensões das folhas, podendo ser lanceoladas, pequenas, médias, grandes, largas, curtas, estreitas e elípticas (Barranco et al., 1999).

As folhas da oliveira tem sido usadas na medicina tradicional com o intuito de tratar e prevenir diabetes (Komaki et al., 2003), estando também aliadas ao combate de dores de cabeça, febres, arteriosclerose, gota, reumatismo e hipertensão, devido ao fato de estas possuírem propriedades antissépticas, hipoglicémicas e diuréticas (Benavente-Garcia et al., 2000; Somova et al., 2003; Meirinhos et al., 2005; Sato et al., 2007; Haloui et al., 2010).

Para além do seu uso na medicina tradicional, desde 1854, que estas têm sido alvo de estudos científicos, sendo o primeiro estudo conhecido sobre o uso de pó da folha de oliveira para o tratamento da febre e da malária (Lee-Huang et al., 2003). Após este início da investigação científica relativa às folhas de oliveira, numerosos trabalhos têm demonstrado as propriedades benéficas dos seus extratos. Os ensaios experimentais em animais de laboratório e os ensaios clínicos efetuados revelaram efeitos hipoglicémicos e hipotensores atribuídos às folhas de oliveira (Somova et al., 2003; El e Karakaya, 2009), sendo que outros estudos revelaram a capacidade dos seus extratos diminuírem a pressão arterial em animais e aumentarem o fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, diminuindo a incidência das arritmias e prevenindo espasmos musculares intestinais (Benavente-Garcia et al., 2000; Singh et al., 2006). Outros ensaios demostraram que os extratos possuem várias atividades biológicas, destacando-se a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana ou antiviral com capacidade de inibir a infeção e transmissão entre células do HIV-1 (Komaki et al., 2003; Lee-Huang et al., 2003;

Kontogianni e Gerothanassis, 2012; de Bock et al., 2013). Estas propriedades medicinais associadas às folhas de oliveira têm sido atribuídas à sua composição rica em compostos fenólicos. As folhas possuem uma maior capacidade antioxidante e poder bloqueador de radicais (El e Karakaya, 2009) e é nas folhas que existe uma maior concentração de compostos fenólicos (de Bock et al., 2013), quando comparando com as restantes partes da árvore.

2.2.1. Compostos fenólicos na folha da oliveira

Se o fruto da oliveira – a azeitona – tem sido amplamente estudada pelo seu uso alimentar, as folhas da oliveira são estudadas pelos seus metabolitos secundários. Destes, devem-se destacar os compostos fenólicos, metabolitos secundários produzidos pelas plantas face à agressão por microrganismos e radiação ultravioleta (Arantes, 2008). Estes compostos têm como principal característica uma forte capacidade antioxidante (Savarese et al., 2007; Rodríguez et al., 2008), comparável ou superior ao descrito para outros compostos antioxidantes, tais como as vitaminas C e E e o β-caroteno (Arantes, 2008).

Quimicamente, os compostos fenólicos definem-se como substâncias com um anel aromático (C_6), com ligações a um ou mais grupos hidroxilos (-OH), incluindo os seus derivados funcionais (ésteres, glicósidos, metiléteres). Se definirmos os fenóis vegetais em termos de origem metabólica, estes são substâncias produzidas no metabolismo fenilpropanoide, pela via chiquimato (Ryan et al., 2002).

No caso concreto da oliveira, a composição fenólica individual varia de cultivar para cultivar (Meirinhos et al., 2005), e também têm sido detetadas diferenças na identificação e quantificação destes compostos, causadas pela variação do método de extração (Pereira et al., 2007) e época de colheita (Brahmi et al., 2013). Os compostos fenólicos encontram-se em todas as partes da planta, mas a sua natureza química e concentração variam muito nos diferentes tecidos (Ryan et al., 2002). Os que se encontram presentes na folha de oliveira constituem uma fração muito complexa formada por um número variado de produtos, alguns dos quais permanecem por identificar (Ferreira, 2007), isto porque a maioria dos compostos fenólicos é armazenada quase que exclusivamente sob a forma conjugada. Ao que parece, há várias razões para a forma conjugada: a fraca toxicidade de alguns compostos é evitada desta maneira, favorece a solubilidade e o depósito em certos compartimentos celulares e, parece estar, também, relacionada com o transporte dos compostos às células, inclusive

transporte intracelular (Ryan et al., 2002). Existem inúmeros compostos fenólicos presentes na natureza, que, de forma a facilitar o seu estudo, são classificadas em diferentes classes, dependendo do número de átomos de carbono e da sua estrutura básica (Van Sumere, 1989).

Na folha de oliveira, os compostos fenólicos predominantes incluem os ácidos fenólicos, os flavonóides, os álcoois fenólicos e os secoiridóides da oleuropeína, pois como estes últimos possuem carácter fenólico são igualmente considerados como compostos fenólicos (Ryan et al., 1999). Como referido anteriormente, os compostos maioritários são a oleuropeína, luteolina 7-*O*-glucósido, hidroxitirosol e a apigenina 7-*O*-glucósido.

2.2.1.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos incluem os ácidos benzóicos (C_6-C_1) e os ácidos cinâmicos (C_6-C_3). Como se encontram normalmente hidroxilados, designam-se também por ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Compostos como o ácido gálico, ácido siríngico, ácido vanílico e vanilina (Figura 2) fazem parte da classe dos ácidos hidroxibenzóicos. Surgindo como o maior grupo de compostos fenólicos não flavonóides presentes nas folhas de oliveira (Ryan et al., 1998; Caturla et al., 2005; Micol et al., 2005), os ácidos hidroxicinâmicos surgem principalmente sob a forma de glicósidos ou na forma de combinações do tipo éster. Entre os vários ácidos hidroxicinâmicos identificam-se como principais na folha da oliveira o ácido cafeico, bem como o seu derivado, verbascósido (Ghanbari et al., 2012), o ácido ρ-cumárico, o ácido 4-cumárico, o ácido clorogénico, o ácido elenólico, o ácido ferúlico e o ácido sináptico (Figura 2).

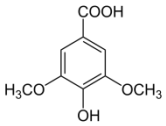
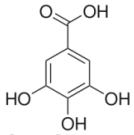
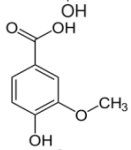
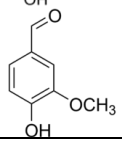
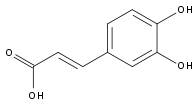
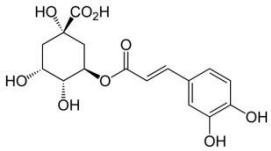
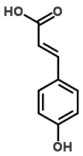
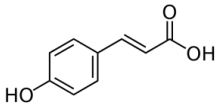
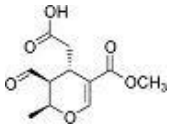
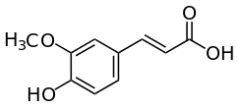
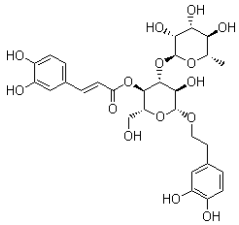
	Classe	Compostos fenólicos	Estrutura química
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzóicos	Ácido siríngico	
		Ácido gálico	
		Ácido vanílico	
		Vanilina	
	Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido cafeico	
		Ácido clorogénico	
		Ácido 4-cumárico	
		Ácido *ρ*-cumárico	
		Ácido elenólico	
		Ácido ferúlico	
		Verbascósido	

Figura 2 – Ácidos fenólicos presentes nas folhas de oliveira.

2.2.1.2. Flavonóides

Os flavonóides são o grupo mais comum de compostos polifenólicos na dieta humana, com mais de 1600 tipos (Charoenprasert & Mitchell, 2012). São moléculas planas, "planar molecules", caracterizadas pela presença de dois anéis aromáticos benzénicos ligados por uma cadeia com três átomos de carbono, cuja estrutura geral é representada por C_6-C_3-C_6. A variação estrutural encontrada nesta classe de compostos provém das modificações por hidroxilação, metilação, prenilação, glicosilação ou acilação dos hidroxilos (Ferreira et al., 1997). Os flavonóides agliconas dividem-se em flavonas (Figura 3), flavonóis, flavanonas e flavanóis (Figura 4), dependendo da presença de uma ligação dupla entre C_2 e C_3 e de um grupo hidroxilo na posição 3, de uma dupla ligação em C_2, um grupo hidroxilo no C_3, e a combinação do carbonilo em C_4 com o grupo hidroxilo no C_3, respetivamente (Ryan et al., 2002; Bendini et al., 2007).

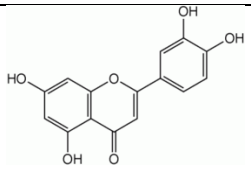
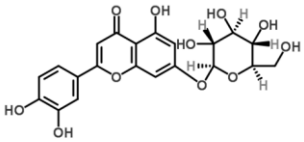
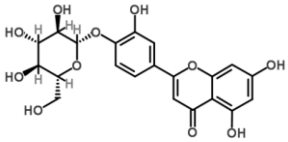
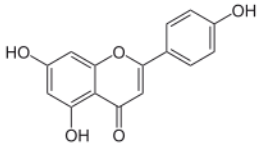
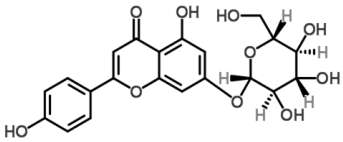
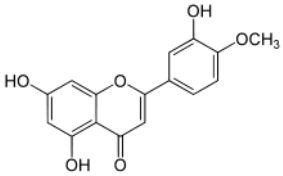
	Classe	Compostos fenólicos	Estrutura química
Flavonóides	Flavonas	Luteolina	
		Luteolina 7-*O*-glucósido	
		Luteolina 4'-*O*-glucósido	
		Apigenina	
		Apigenina 7-*O*-glucósido	
		Diosmetina	

Figura 3 – Flavonas presentes nas folhas de oliveira.

As folhas de oliveira possuem uma grande quantidade de flavonóides, destacando-se maioritariamente as flavonas luteolina e seus derivados *O*-glucosilados luteolina 7-*O*-glucósido e luteolina 4'- *O*-glucósido, a apigenina e seus derivados apigenina 7-*O*-glucósido e apigenina 7-*O*-rutinósido e, com menos frequência a diosmetina. A quercetina, quercitrina ou quercetina-3-*O*-ramnósido e a rutina ou quercetina 3-*O*-rutinósido são flavonóis citados nas folhas de oliveira, enquanto que a hesperidina e a hesperitina são as flavanonas descritas na folha de oliveira (Figura 4) (Benavente-Garcia et al., 2000; Ryan et al., 2002).

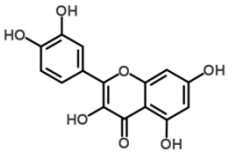
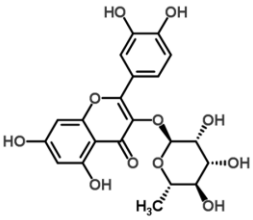
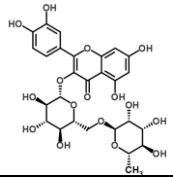
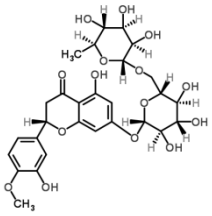
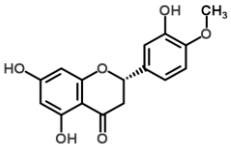
	Classe	Compostos fenólicos	Estrutura química
Flavonóides	Flavonóis	Quercetina	
		Quercitrina ou Quercetina-3-*O*-ramnósido	
		Rutina ou Quercetina-*O*-rutinósido	
	Flavanonas	Hesperidina	
		Hesperitina	

Figura 4 – Flavonóis e flavanonas presentes nas folhas de oliveira.

2.2.1.3. Secoiridóides

Os compostos fenólicos (Figura 5) classificados como secoiridóides resultam do metabolismo secundário dos monoterpenos, e estão presentes apenas nas plantas da família das *Oleaceae*. Normalmente derivados dos oleosídeos caracterizam-se pela presença de ácido elenólico (ou um seu derivado) na sua estrutura e são os compostos mais abundantes na folha de oliveira (Soler-Rivas et al., 2000).

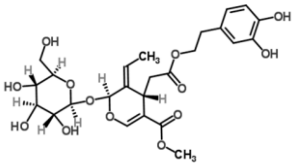
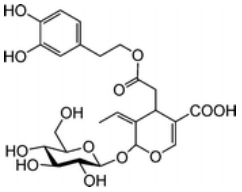
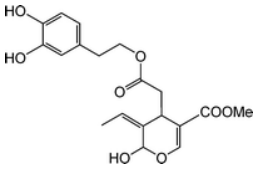
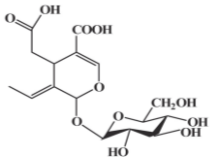
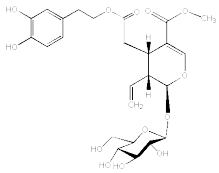
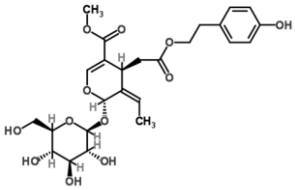
	Secoiridóides fenólicos	Estrutura química
Secoiridóides fenólicos	Oleuropeína	
	Dimetiloleuropeína	
	Oleuropeína aglicona	
	Oleósido	
	Oleurósido	
	Ligstrósido	

Figura 5 – Secoiridóides fenólicos presentes nas folhas de oliveira.

O principal secoiridóide presente na folha é a oleuropeína (Figura 5) (El e Karakaya, 2009), podendo alcançar concentrações de 60-90 mg/g por matéria seca de folhas, surgindo por vezes outros secoiridóides derivados da oleuropeína como a dimetiloleuropeína. Por não se encontrar presente em todas as cultivares, o composto demetiloleuropeína pode ser indicado como um marcador químico (Esti et al., 1998; Charoenprasert e Mitchell, 2012). Os secoiridóides fenólicos ligstrósido e oleósido, também se encontram presentes, em níveis consideráveis, nas folhas de oliveira.

2.2.1.4. Álcoois fenólicos

Os álcoois fenólicos, como o tirosol (*p* -hidroxifeniletanol ou *p*-HPEA) e o hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol ou 3,4-DHPEA) (Figura 6), também podem ocorrer como derivados da degradação da oleuropeína (Micol et al., 2005).

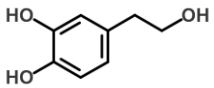
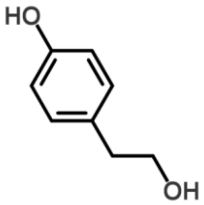
	Compostos fenólicos	Estrutura química
Álcoois fenólicos	Hidroxitirosol	
	Tirosol	

Figura 6 – Álcoois fenólicos presentes nas folhas de oliveira.

2.2.2. Atividade antioxidante dos compostos fenólicos

Uma das propriedades de maior interesse dos compostos fenólicos é a sua atividade antioxidante, comprovada por diversos métodos e estudos. Esta capacidade antioxidante advém do fato de serem capazes de retardar ou mesmo inibir a oxidação de lípidos ou outras moléculas oxidáveis, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação (MacDonald-Wicks et al., 2006; Xu, 2012). Estes compostos inibem a formação de radicais livres, eliminando radicais importantes, através da doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Soares, 2002; Xu, 2012). Os radicais livres, geralmente denominados de espécies reativas de oxigénio (ROS) são produzidos durante o mecanismo celular. As ROS são moléculas quimicamente reativas e instáveis, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos (Aruoma, 1996; Gülcin, 2007). São derivadas da redução sucessiva de oxigénio molecular para H_2O. Incluem radicais livres como é o caso do anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), do radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e também do oxigénio singleto ($^1O_2$) (Aruoma, 1996).

Sendo a produção de espécies reativas de oxigénio uma consequência natural do metabolismo aeróbio, quando presentes em baixas concentrações, podem ser benéficas

para as células (Laguerre et al., 2007), pois são responsáveis pelo transporte de eletrões na cadeia respiratória, atuando como moléculas sinalizadoras (Dowling e Simmons, 2009). No entanto, passam a ter um efeito prejudicial para o organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção e quando há diminuição de agentes antioxidantes. Este desequilíbrio causa o denominado *stress* oxidativo (Laguerre et al., 2007). O *stress* oxidativo é assim definido como um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes.

O efeito prejudicial derivado da produção excessiva de ROS resulta na lesão de biomoléculas celulares, tais como proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e lípidos causando dano celular e tecidual (Aruoma,1996). A produção incontrolável de ROS representa uma responsabilidade acrescida relacionada com a maioria dos principais problemas de saúde do mundo industrializado, nomeadamente tumores (cancro da próstata e do cólon) e doenças coronárias, estando também relacionados com o envelhecimento do corpo (Briante et al., 2002).

Vários estudos têm demonstrado que, consumidas na dieta diária, as substâncias antioxidantes podem resultar numa ação protetora eficaz na redução dos processos oxidativos. Devido ao crescente interesse pelos produtos de origem natural, os antioxidantes naturais das plantas e a sua importância na medicina, nutrição e indústria alimentar, têm recebido muita atenção da parte da comunidade científica. Foi também demonstrado que as plantas contêm vários compostos antioxidantes naturais, tais como vitaminas (E e C), pigmentos naturais (carotenoides), enzimas (catálase e superóxido dismutase, entre outras) e compostos fenólicos (Floch et al., 1998; Soni et al., 2006; Laguerre et al., 2007).

Dentro destes compostos antioxidantes naturais, deve-se dar destaque aos compostos fenólicos, uma vez que são substâncias biologicamente ativas (Zheng e Wang, 2001), abundantemente presentes na dieta humana (Abdel-Hameed, 2009). Apresentam efeitos autoprotetivos, contribuindo para prevenir o *stress* oxidativo, reduzindo o risco de contrair doenças coronárias e alguns tipos de cancro, uma vez que impede a peroxidação das lipoproteínas de baixa densidade e dos lípidos em geral, inibindo também as enzimas envolvidas nos processos inflamatórios (Rice-Evans et al., 1996). Além disso, como referido anteriormente, os compostos fenólicos possuem atividades antibióticas, anti-alergénicas e anti-inflamatórias (Tapiero et al., 2002; Manach et al., 2006), estando as atividades biológicas da folha de oliveira ligadas à presença destes compostos (Bao et al., 2007).

2.3. A folha da oliveira e potencial para o uso na indústria agroalimentar

Na região mediterrânica, uma das principais fontes de subprodutos agroalimentares é a indústria da oliveira e do azeite (Peralbo-Molina e Castro, 2013). Nesta indústria são gerados diversos tipos de subprodutos: as águas-ruças, a massa de azeitona, e as folhas. Como referido anteriormente, estas podem representar entre 5% e 10% do peso de azeitona à entrada do lagar. Assim, e de modo a reduzir custos, aumentando a sustentabilidade da atividade do sector olivícola, estes subprodutos deverão ser valorizados. Por um lado, uma utilização comum das folhas da oliveira é o seu uso como alimento para animais (Altıok et al., 2008; Ahmad-Qasem et al., 2013a), por outro lado, devido à sua composição, da qual se destaca a presença em oleuropeína e em hidroxitirosol (Micol *et al*., 2005), as folhas de oliveira têm chamado a si algum interesse de forma a serem usadas com fonte de compostos bioativos.

Aliando este fator ao interesse considerável, principalmente da indústria alimentar, na procura antioxidantes naturais, com propriedades funcionais, capazes de manter ou melhorar a qualidade dos géneros alimentícios (Siger et al., 2012), reduzindo o uso de antioxidantes sintéticos, aos quais têm sido atribuídas propriedades tóxicas e carcinogénicas (Prasad et al., 2009; Sasaki et al., 2002), as folhas poderão ser vistas como uma boa fonte de compostos de interesse para a indústria agroalimentar.

Neste sentido, o uso de compostos proveniente de origens vegetais, de modo a reduzir ou eliminar a oxidação lipídica que ocorre nos alimentos é uma das mais promissoras formas de valorização de resíduos.

2.4. Oxidação lipídica

Os processos de oxidação lipídica em óleos, gorduras e alimentos gordurosos são uma das principais causas da redução do tempo de vida de prateleira dos géneros alimentícios industrializados bem como dos produtos que a partir deles são formulados (alimentos, medicamentos, cosméticos) (Rodrigues et al., 2005). Torna-se pois necessário o conhecimento e a compreensão dos mecanismos de reação destes processos, bem como as suas formas de controlo uma vez que são de extrema importância económica na indústria alimentar.

As propriedades organolépticas, nomeadamente a cor, o *flavor*, a textura, associadas à qualidade de um produto, e extremamente valorizadas pelo consumidor, estão ligadas aos lípidos presentes no alimento. Estes conferem também valor nutritivo ao alimento, nomeadamente através de ácidos gordos essenciais (ácidos linoléico,

linolénico) e vitaminas (A, D, E) (St. Angelo, 1996; Rodrigues et al., 2005). Os lípidos são constituídos por monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos, ácidos gordos livres, glicolípidos, fosfolípidos, esteróis e outras substâncias. Entre estas substâncias, os ácidos gordos insaturados são as estruturas mais susceptíveis à oxidação (Sims et al, 1980; Hamilton et al, 1983; Berset e Cuvelier 1996).

A oxidação lipídica representa a principal causa da deterioração de lípidos e matérias gordas, ocorrendo durante o processamento, distribuição e armazenamento dos alimentos. É responsável pelo desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis (característicos do ranço), bem como pelas modificações do *flavor* original do alimento, tornando os alimentos impróprios para o consumo e levando à rejeição ou depreciação do género alimentício por parte do consumidor e do transformador industrial. A oxidação lipídica provoca também outras alterações que, além de afetarem a perda de qualidade nutricional do alimento, devido à degradação de ácidos gordos essenciais e de vitaminas lipossolúveis, também afetam a integridade e a segurança alimentar, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (Kubow, 1993; Silva et al., 1999).

Os diferentes fenómenos de oxidação de lípidos estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra, sendo influenciados por fatores como a natureza e o número de insaturações presentes, a atividade da água, a presença de oxigénio, a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes ou de antioxidantes, são determinantes para a estabilidade oxidativa dos lípidos (Frankel et al. 1994; Berset e Cuvelier, 1996)

Assim sendo, os lípidos podem sofrer oxidação de diversas formas: reações hidrolíticas, oxidação enzimática, foto-oxidação e auto-oxidação.

2.4.1. Reações hidrolíticas

As reações hidrolíticas ocorrem na presença de humidade. As reações são catalisadas através das enzimas lipases presentes nos alimentos, com formação de ácidos gordos livres. As reações hidrolíticas também ocorrem por via “não enzimática”, em processos de fritura, onde se verificam a produção de ácidos gordos livres a altas temperaturas (Barrera-Arellano, 1993).

2.4.2. Oxidação enzimática

A oxidação por via enzimática ocorre pela ação da enzima lipoxigenase. Estas enzimas atuam sobre os ácidos gordos polinsaturados (ácido linolénico e linoleico), catalisando a adição de oxigénio à cadeia hidrocarbonada polinsaturada. Como resultado surgem a formação de peróxidos e hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas que se podem envolver em várias reações de degradação (Halliwell et al. 1995; Silva et al., 1999).

2.4.3. Foto-oxidação

O efeito fotoquímico direto da luz (radiação UV) nos ácidos gordos dá-se com a presença de foto-sensibilizadores (clorofila, riboflavina, mioglobina). Estes absorvem intensamente a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível, acumulando a energia e transferindo-a posteriormente para o oxigénio tripleto ($^3O_2$), que passa para o estado singleto ($^1O_2$) (Berger e Hamilton, 1995). O oxigénio singleto, mais reativo e menos estável que o tripleto, reage com os ácidos gordos insaturados. O mecanismo envolve reações diretas do oxigénio singleto com as ligações duplas existentes nos ácidos gordos insaturados, resultando na formação de hidroperóxidos, diferentes dos que observam na ausência de luz e de sensibilizadores, que rapidamente se decompõem originando compostos indesejáveis, como é o caso de aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (Hamilton et al., 1983; Jadhav et al., 1996).

2.4.4. Auto-oxidação

O principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras é a auto-oxidação (Berger e Hamilton, 1995). Trata-se de um mecanismo complexo, associado à reação do oxigénio com ácidos gordos insaturados, que ocorre em três etapas ou fases (Farmer et al., 1942), descritas resumidamente de seguida:

Iniciação: ocorre a formação de radicais livres do ácido gordo (RH), devido à remoção de um hidrogénio ($H^\bullet$) do carbono alílico na molécula do ácido gordo, em condições favoráveis de luz e calor. O radical livre ($R^\bullet$) é altamente instável e reativo, podendo interagir com outros constituintes dos alimentos, alterando a sua qualidade nutricional.

$$RH \rightarrow R^\bullet + H^\bullet$$

Propagação: aparecimento dos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), devido à conversão dos radicais livres (suscetíveis ao ataque do oxigénio atmosférico) em outros radicais, cuja estrutura depende da natureza dos ácidos gordos presentes. Os peróxidos ($ROO^{\bullet}$) e hidroperóxidos (ROOH) são instáveis e decompõem-se em aldeídos, álcoois, ácidos, sendo responsáveis por fenómenos como o ranço. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação com o O_2, gerando um radical peróxido.

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

Terminação: Dois radicais livres formados reagem entre si, formando produtos estáveis, ou seja, os produtos secundários da oxidação, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).

$$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$$

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow R$$

2.5. Antioxidantes e oxidação lipídica

De forma a evitar a auto-oxidação de óleos e gorduras e assim aumentar a estabilidade oxidativa destes, há a necessidade de se diminuírem todos os fatores que a favorecem (presença de luz, temperatura, oxigénio) e que são responsáveis pela formação de radicais livres (Jorge e Gonçalves, 1998).

Das diferentes formas de aumentar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras destacam-se o uso de antioxidantes, a diminuição do conteúdo em ácido linolénico e a hidrogenação.

A adição de compostos antioxidantes sintéticos aos alimentos é uma prática corrente no seu fabrico, mas devido a efeitos indesejáveis na saúde humana, causada por estes, surgiu a necessidade de pesquisa e estudo de novos compostos naturais. Para estes serem passiveis de uso na indústria alimentar, têm de apresentar algumas características, nomeadamente baixo custo de obtenção, eficácia a baixas concentrações,

compatibilidade com o alimento, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência, características organoléticas agradáveis e ausência reconhecida de toxicidade (Moreira e Mancini-Filho, 2004).

2.6. Manteiga e margarina

A manteiga é definida, na legislação portuguesa, como "o produto butiroso obtido exclusivamente do leite de vaca ou da sua nata, apresentando-se sob a forma de uma emulsão sólida e maleável ", segundo o nº1 do Artigo 2º, da Portaria 110/88 de 15 de Fevereiro. É um produto de origem animal, portanto, tem na sua composição predominantemente gorduras saturadas (Quadro 1), que, em excesso, são prejudiciais à saúde. Por outro lado, a margarina é definida na alínea c), do artigo 2º, da Portaria 947/98 de 3 de Novembro como o "produto obtido a partir de gorduras e óleos vegetais e ou animais, com um teor mínimo de matérias gordas de 80% e inferior a 90%, com consistências variáveis, consoante o fim a que se destinam", sendo um produto de origem vegetal, rica em ácidos gordos mono- e polinsaturados (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição nutricional de manteiga com sal e margarina (valores por 100 g de parte edível). Adaptado de Tabela da composição de alimentos – INSA, 2014.

	Componentes	Manteiga com sal	Margarina
Energia	Energia (kcal/kJ)	739/ 3093	524/ 2190
Macronutrientes	Água (g)	16,0	16,0
	Proteína (g)	0,1	0,1
	Gordura Total (g)	81,8	80,0
	Total Hidratos de carbono disponíveis (g)	0,7	0,4
Ácidos gordos	Ácidos gordos saturados (g)	46,3	40,2
	Ácidos gordos monoinsaturados (g)	18,9	17,2
	Ácidos gordos polinsaturados (g)	2,4	22,3
	Ácidos gordos *trans* (g)	3,3	0
	Ácido linoléico (g)	2,0	20,1
Colesterol	Colesterol (mg)	230	2
Vitaminas	Vitamina A total (unidade equivalente a μg de retinol)	565	600
	Caroteno (μg)	45	400
	Vitamina D (μg)	0,74	0,2
	α-Tocoferol (mg)	2,0	18
	Riboflavina (mg)	0,020	0
Minerais	Sódio (mg)	751	1200
	Potássio (mg)	15	6
	Cálcio (mg)	15	3
	Fósforo (mg)	24	6
	Magnésio (mg)	2,0	1
	Ferro (mg)	0,2	0,3
	Zinco (mg)	0,1	0,1

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Avaliação da atividade antioxidante de folhas de diferentes cultivares de oliveira

3.1.1. Amostras

No presente trabalho foram utilizadas amostras de folhas de oliveira, *Olea europaea* L., das cultivares Arbequina, Cobrançosa, Galega vulgar e Picual. As amostras foram recolhidas em olivais na região de Beja em meados do mês de julho. De cada cultivar, selecionaram-se aleatoriamente 10 árvores onde foram recolhidos ramos de cerca de 30 cm de comprimento e 2 anos de idade, que foram transportados para laboratório no mais curto espaço de tempo. Em laboratório, foram retiradas as folhas dos ramos, desprezando as das extremidades, por não estarem completamente formadas, as mal formadas e as que apresentavam sintomas de ataque de pragas ou doenças. Posteriormente procedeu-se à secagem das folhas, à temperatura ambiente e à sombra. Após secagem as amostras foram embaladas em sacos plásticos e mantidas no escuro até posterior utilização.

Figura 7 – Folhas de oliveira de diferentes cultivares de oliveira: Arbequina (A), Cobrançosa (B), Galega vulgar (C) e Picual (D).

3.1.2. Preparação dos extratos de folhas de oliveira

Para a determinação da atividade antioxidante das folhas de diferentes cultivares de oliveira procedeu-se à preparação de extratos. De cada uma das amostras foram retiradas 20g de folhas que foram trituradas (≤ 20 mesh) e colocadas em tubos de Falcon etiquetados e armazenados num local escuro e seco (exsicador). Para a preparação dos extratos pesaram-se cerca de 1,5g de pó de cada amostra, numa balança eletrónica modelo Acculab ALC-210.4, que foi dissolvido em 25 mL de metanol e extraído durante 30 minutos. Posteriormente foi filtrado com papel de filtro Whatman no. 4 para um balão de evaporador, previamente pesado. Recolheu-se o resíduo do papel

de filtro, juntou-se novamente 25 mL de metanol e voltou-se a extrair. A operação foi repetida mais uma vez. Levou-se o balão ao evaporador rotativo (Stuart RE 3000), com temperatura do banho de 40ºC, evaporando-se a maior quantidade possível de metanol. Seguidamente transferiu-se o balão para a estufa a fim de evaporar o restante metanol. Após terem arrefecido, os extratos foram dissolvidos em água destilada para obter uma concentração de 50 mg/mL. A partir da concentração obtida, prepararam-se diferentes concentrações variando entre 0,01 e 5 mg/mL.

3.1.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada através dos seguintes métodos: avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), avaliação do poder redutor e quantificação de fenóis totais.

3.1.3.1. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Para avaliar a capacidade para bloquear radicais de DPPH dos extratos de folhas da oliveira, foi usado o método descrito por Hatano et al. (1988). Para isso, foram misturados 0,3 mL de soluções de várias concentrações de extrato com 2,7 mL de solução metanólica (6 x 10-5 mol/L) de DPPH (Alfa Aesar). Após agitação vigorosa desta mistura, colocou-se, durante 60 minutos, no escuro à temperatura ambiente, até se obterem valores estáveis de absorvância. A capacidade bloqueadora dos radicais foi medida através de leitura espectrofotométrica da absorvância da mistura a 517nm, apresentando-se os resultados em percentagem da descoloração do DPPH, calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{DPPH}-A_A)/A_{DPPH}] \times 100$$

em que os valores de A_A correspondem à absorvância da solução com extrato da amostra e os valores de A_{DPPH} à absorvância da solução de DPPH. A concentração correspondente a 50% de inibição (EC_{50}) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato.

3.1.3.2. Determinação do poder redutor

Para a avaliação do poder redutor dos extratos, foi seguido a metodologia descrita por Berker et al. (2007). Assim, 1mL de solução de extrato, a várias concentrações, foi misturada com 2,5mL de tampão de fosfato de sódio (Sigma Chemical Co.) 0,2M com

pH 6,6 e com 2,5mL de solução de ferricianeto de potássio a 1% (Sigma Chemical Co.). Esta mistura foi agitada e colocada em banho-maria, a 50ºC, durante 20 minutos. Após arrefecimento, adicionaram-se 2,5mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) (Sigma Chemical Co.), agitando vigorosamente. Retiraram-se 2,5mL de sobrenadante resultante, adicionando-se a estes 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de 0,1% de cloreto de ferro (III) (Sigma Chemical Co.). A capacidade redutora dos extratos foi avaliada pela leitura da absorvância a 700nm, no espectrofotómetro de ultravioleta e visível (Genesys™ 10 UV).

Neste ensaio, um aumento na absorvância indica um maior poder redutor das amostras. A cor amarela da solução inicial muda para vários tons de verde e azul, dependendo do poder redutor de cada extrato (Alasalvar et al., 2006), devido à presença de agentes com capacidade redutora (antioxidantes), que provocam a redução do complexo Fe^{3+}/ferricianeto a uma forma ferrosa, com coloração azul "Perl's Prussian" (Ferreira et al., 2007). A concentração de extrato correspondente a 0,5 de absorvância (EC_{50}) foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância registada a 700 nm em função da concentração de extrato correspondente.

3.1.3.3. Quantificação dos fenóis totais

A quantificação do teor em fenóis totais foi efetuada seguindo o método de Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. Assim, a 1mL de solução de extrato, a várias concentrações, adicionou-se 1mL de reagente de Folin e Ciocalteu, agitando-se, deixando depois reagir durante 3 minutos. Após este tempo, adicionou-se 1mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 7 mL de água destilada, agitando-se. Esta reação foi colocada no escuro e deixada a reagir durante 90 minutos, lendo-se depois a absorvância a 725 nm. Usou-se o ácido cafeico para calcular a curva de calibração. Os resultados são assim expressos em miligramas de Equivalente de ácido cafeico por grama de extrato.

3.2. Influência da adição de extratos de folhas de oliveira no processo oxidativo de manteiga e margarina

3.2.1. Caracterização das matérias-primas

Para as amostras de manteiga foi escolhida a marca comercial "Manteiga dos Açores Pingo Doce", com lote L24412. Relativamente à margarina, foi escolhida a marca comercial "Planta" com lote L424900098 (Figura 8). Foram ambas adquiridas numa grande superfície comercial de Bragança. Nesta fase do trabalho foram utilizados extratos aquosos (3.2.2) da cultivar Arbequina, por terem sido os extratos desta cultivar os que apresentaram melhores resultados em três dos quatro parâmetros avaliados (Quadro 2).

A

B

Figura 8 - Apresentação comercial de Manteiga dos Açores (A) e de Margarina Planta (B).

3.2.2. Caraterização fitoquímica das folhas de oliveira recorrendo à Ressonância Magnética Nuclear de Protão (RMN ^{1}H)

Os extratos foram redissolvidos em água deuterada e os seus espectros de RMN ^{1}H foram obtidos utilizando um Espectrómetro *Bruker Avance III 600MHz* (a 14,1 T, 25 ºC), operando com uma sonda QXI de 5 mm equipada com um gradiente em z (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Alemanha), de acordo com Dias et al. (2014). Os espectros de RMN ^{1}H (com supressão do solvente) foram adquiridos com uma largura de varrimento de 6 kHz, utilizando um tempo de espera de 14 segundos para permitir o relaxamento total do protão, uma pré-saturação da água de 3 segundos, um ângulo de pulso de 45º, um tempo de aquisição de 3,5 segundos e, pelo menos, 128 scans. Antes da transformada de Fourier, cada decaimento do sinal foi multiplicado por 0,2 Hz lorentziano. O fumarato de sódio (2 mM) foi utilizado como padrão interno (6,5 ppm) para identificar os seguintes compostos (multipleto, δ, ppm): α-glucose (dupleto, 5,22); sacarose (dupleto, 5,4); oleuropeína (singleto, 5,77); luteolina-4'-*O*-glucósido (dupleto,

6,0); luteolina (singleto, 6,37); hidroxitirosol acetato (dupleto, 6,75); hidroxitirosol (dupleto, 6,81); luteolina-7-*O*-glucósido (singleto, 7,44). As áreas relativas das ressonâncias de protão foram quantificadas usando uma curva de ajuste fornecida pelo programa de análise de RMN NUTSpro (Acorn RMN, Inc, Fremont, CA).

3.2.3. Preparação dos extratos de folhas de oliveira

Os extratos aquosos das amostras foram preparados pesando cerca de 5,0 g de pó de amostra, numa balança eletrónica modelo Acculab ALC-210.4. Posteriormente foi dissolvido em 250 mL de água destilada. As amostras foram levadas à ebulição, numa placa de aquecimento durante 45 minutos, sendo filtradas, usando papel de filtro Whatman no. 4. Após arrefecidos, os extratos aquosos foram congelados e liofilizados.

3.2.4. Preparação das amostras de manteiga e margarina com adição de extratos de folhas de oliveira

Pesaram-se 175g de amostra (manteiga ou margarina) para um copo de vidro de 250 mL. Aqueceram-se em banho-maria, 30ºC, durante 5 minutos, de forma a conseguir trabalhar a amostra mais facilmente. Misturou-se o extrato, homogeneizando cuidadosamente a mistura, com ajuda de uma vareta de vidro, de modo a obter uma concentração 0,1 mg de extrato/g de amostra. Distribuíram-se 35g de amostra com extrato para cada uma de cinco placas de Petri plásticas, de 9 cm de diâmetro, devidamente identificadas. Repetiu-se o procedimento para as concentrações de 0,25 mg/g, 0,5mg/g e 1 mg/g de extrato. O ensaio controlo foi efetuado com as amostras sem adição de extrato.

3.2.5. Condições de oxidação

As placas contendo as amostras de manteiga e margarina foram expostas a condições de oxidação, colocando as placas expostas à luz e sem tampa, de modo a permitir a permitir a ocorrência de oxidação acelerada pelo efeito sinérgico da luz e da exposição ao oxigénio. De modo a garantir um efeito uniforme sobre as amostras, a manteiga/margarina presente em cada placa foi homogeneizada diariamente. Para cada uma das matrizes trabalhadas (manteiga e margarina), e para cada uma das placas, foi avaliada o efeito da adição de extrato na cor, no teor em fenóis totais e na atividade antioxidante.

3.2.6. Determinação da cor

Para a determinação deste parâmetro nas amostras, usou-se um colorímetro Minolta CR-400. Os resultados foram expressos nos modos CIELAB e Hunter, avaliando-se as coordenadas tricromáticas L*, a* e b*, no modo CIELAB, e L, a e b, no modo Hunter. Previamente a qualquer leitura, o colorímetro foi calibrado usando um padrão branco de referência. A coordenada L/L* refere-se à luminosidade da amostra (negro-0 a branco-100), enquanto a/a* representa a coordenada que reflete o grau de aproximação à cor vermelha, quando positivo, ou verde, quando negativo, e a coordenada b/b* descreve a cor amarela, quando positiva e azul quando negativa.

Para a determinação da cor, foram efetuadas leituras em triplicado, em cada uma das cinco placas correspondentes a cada concentração de extrato adicionado e ao ensaio controlo, selecionando ao acaso o local onde se colocaria o colorímetro. As placas, a diferentes concentrações de extrato e amostra, foram mantidas na luz à temperatura ambiente, determinando-se a cor no início do ensaio, 5º dia e 10º dia de ensaio.

Nas amostras foi também avaliada a variação de cor (ΔE), comparando as coordenadas CIELAB L*, a*,e b*, entre o ensaio controlo (sem adição de extrato) e as amostras contendo extrato, recorrendo à fórmula descrita por Hunter (1973),

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{\frac{1}{2}}$$

onde $\Delta L^* = L_{controlo} - L_{amostra}$; $\Delta a = a_{controlo} - a_{amostra}$; $\Delta b = b_{controlo} - b_{amostra}$.

Calculou-se também o Índice de Amarelecimento (YI), de acordo com Francis e Clydesdale (1975):

$$YI = 142.86 b^*/L^*$$

3.2.7. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das amostras foi analisada através dos seguintes métodos: avaliação do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), efeito sequestrante do radical Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfónico (ABTS•+) e quantificação de fenóis totais.

3.2.7.1. Preparação dos extratos para avaliação da atividade antioxidante

Para a preparação dos extratos usados na avaliação da atividade antioxidante, pesaram-se 5 g de amostra, que foram dissolvidos em 2,5 mL de n-hexano e extraídos três vezes por centrifugações de 5 minutos a 5000 rpm, com a adição de 2,5 mL de uma mistura de 60% de metanol e 40% de água (v/v). Os três extratos eram combinados, num novo tubo, e usados posteriormente.

3.2.7.2. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

O estudo da capacidade bloqueadora de radicais livres de DPPH, usando extratos de manteiga e margarina, com ou sem adição de extrato, foi feito seguindo a metodologia de Valavanidis et al. (2004), com ligeira modificação. Assim, 0,5 mL de amostra foram adicionados a 3 mL de uma solução metanólica ($1x10^{-4}$ M) de DPPH. Esta mistura foi agitada, deixada a reagir no escuro durante 20 minutos, lendo-se posteriormente a absorvância a 515 nm. Os resultados são apresentados em percentagem da descoloração do DPPH, calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{DPPH}-A_A)/A_{DPPH}] \times 100$$

em que os valores de A_A correspondem à absorvância da solução com extrato da amostra e os valores de A_{DPPH} à absorvância da solução de DPPH.

3.2.7.3. Efeito sequestrante do radical Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfónico (ABTS•+)

A avaliação do efeito sequestrante do radical ABTS foi realizada seguindo a metodologia de Re et al. (1999). Assim, preparou-se uma solução de radical ABTS a 7mM, enriquecida com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (140mM), a qual foi deixada a reagir, no escuro, à temperatura ambiente, durante 12 a 14 horas. A preparação da solução de trabalho foi efetuada, dissolvendo uma alíquota da solução anterior em etanol, até à obtenção de uma absorvância de 0,70 ± 0,02, lida a λ = 734nm. As reações para avaliação da atividade sequestrante foram realizadas diretamente na cuvete de quartzo, adicionando 2mL de ABTS•+ (Branco) a 100µL de amostra ou padrão (Trolox). Os resultados são expressos em µmoL Trolox/mL, tendo-se para isso realizado

previamente um ensaio para a construção de uma reta de calibração com Trolox. As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™10 UV.

3.2.7.4. Quantificação dos fenóis totais

A quantificação do teor em fenóis totais foi efetuada seguindo o método de Capannesi et al. (2000), com algumas modificações. Adicionou-se a 1mL de extrato, 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteau e 1 mL de uma solução de carbonato de sódio (7,5%), perfazendo-se o volume até 10 mL com água desionizada. Esta mistura foi agitada, e refrigerada durante a noite (±12horas), seguindo-se uma centrifugação. A absorvância do sobrenadante foi lida a 765nm, sendo os resultados expressos em mg equivalentes de ácido cafeico/kg amostra, tendo sido preparada anteriormente uma reta de calibração, seguindo a mesma metodologia, com soluções-padrão com concentrações compreendidas entre 0,005 a 0,2 mg/mL.

3.3. Análise estatística

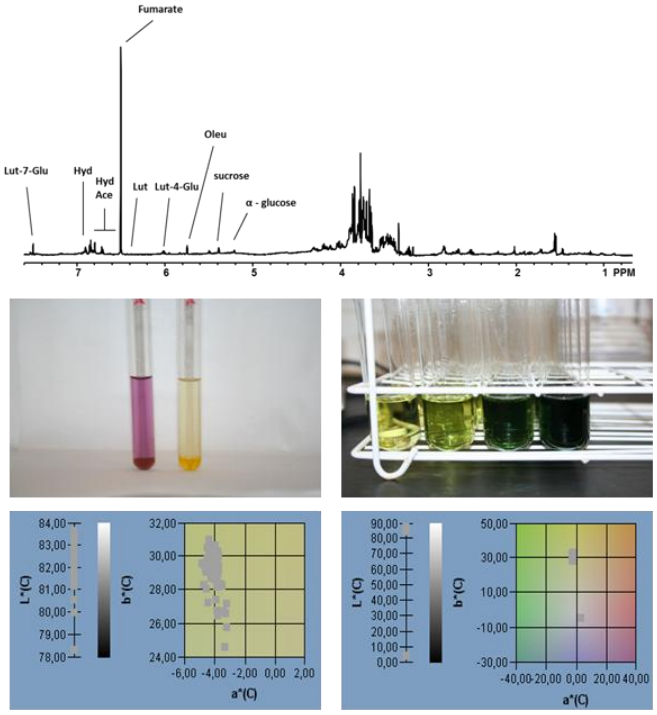
Para a determinação da atividade antioxidante das folhas foram feitas três extrações independentes, procedendo-se em cada uma das extrações à leitura em triplicado. Na avaliação da adição dos extratos à manteiga e margarina, cada uma das placas funcionou como repetição independente, tendo-se procedido à avaliação dos diferentes parâmetros em triplicado. Os resultados apresentados são as médias e o seu desvio-padrão, ou erro-padrão, conforme indicação.

3.3.1. Análise de Variância (ANOVA)

Todas as análises estatísticas foram efetuadas usando o *software* SPSS, versão 19,0 (IBM Corporation, New York, EUA). As variáveis dependentes foram analisadas recorrendo à ANOVA *one-way*, com correção de Welch, sempre que os pressupostos da normalidade e homogeneidade de variâncias não eram cumpridos e, quando estes se verificavam foi aplicado o teste *post-hoc* HSD de Tukey. No teste com correção de Welch, sempre que se observou um efeito significativo ($\rho<0,05$) recorreu-se ao teste de Dunnett T3's. O pressuposto da distribuição normal foi avaliado com recurso aos testes Shapiro-Wilk, pois o número de amostras era inferior a 50, e para o pressuposto da homogeneidade de variâncias este foi avaliado pelo teste de Levene.

3.3.2. Análise de regressão

A análise de regressão foi realizada recorrendo ao *software* Excel da Microsoft Corporation, para avaliar correlações entre teor em fenóis totais nas folhas e os valores de EC_{50}, do ensaio de DPPH e Poder redutor. Efetuou-se a mesma avaliação estatística, para encontrar correlações entre a adição de extrato e o teor em fenóis totais das amostras de manteiga e margarina, entre o teor em fenóis totais e os valores de atividade antioxidante, bem como entre a adição de extrato e os valores de atividade antioxidante.



4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antioxidante de folhas de cultivares de oliveira

No presente trabalho procedeu-se à determinação do teor em fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante de extratos de diferentes cultivares de oliveira, duas que serão as cultivares com maior expressão no território nacional, isto é a Galega vulgar e a Cobrançosa, uma que é a cultivar com maior difusão a nível mundial, a Cv. Picual, e por último, a cultivar mais utilizada em sistemas intensivos de produção de oliveira, a Cv. Arbequina. Os resultados obtidos para o rendimento de extração, teor em fenóis totais e valores de concentração equivalente 50, das diferentes amostras, são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Rendimentos de extração (n=3), teor em fenóis totais (mg. de equivalentes de ácido cafeico/g de extrato) e valores de EC_{50} (mg de extrato/mL) determinados nos ensaios do poder redutor e do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (n=6) de extratos de folhas de diferentes cultivares de oliveira (média±dp).

Cultivar	Rendimento de extração (%)	Fenóis totais (mg/g extrato)	EC_{50} DPPH (mg/mL)	EC_{50} Poder redutor (mg/mL)
Galega vulgar	28,70 ± 1,28 a,b	135,94 ± 4,01 c	0,204 ± 0,024 a	0,271 ± 0,010 b
Cobrançosa	27,04 ± 0,34 b	152,76 ± 3,44 b	0,210 ± 0,027 a	0,366 ± 0,021 a
Picual	28,67 ± 0,68 a,b	147,58 ± 9,59 b	0,154 ± 0,019 b	0,293 ± 0,007 b
Arbequina	30,02 ± 0,17 a	166,45 ± 4,00 a	0,164 ± 0,020 b	0,240 ± 0,020 c
Valor *p*	<0,01**	<0,001*	<0,001*	<0,01*

As médias com letras diferentes indicadas em cada uma das colunas diferem significativamente entre si (p <0,05).
*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA one-way após se ter verificado os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p <0,05) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.
**Os valores de p foram calculados a partir da Análise one-way Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,05) foi aplicado o teste de Dunnett T3's.

Para os diferentes parâmetros avaliados, são visíveis diferenças entre as quatro cultivares testadas. Assim, o rendimento de extração mais elevado foi obtido nos extratos da cv. Arbequina, com 30,02±0,17%, valor este significativamente superior ao rendimento obtido na cultivar com menor rendimento de extração que foi a cv. Cobrançosa, com 27,04±0,34%. As restantes (Galega vulgar e Picual) apresentaram valores semelhantes e que não diferiram estatisticamente de nenhuma das cultivares estudadas.

4.1.1. Quantificação do teor em fenóis totais

Relativamente ao teor em fenóis totais, foi igualmente na cultivar Arbequina que se obtiveram valores mais elevados (Quadro 2). Para esta cultivar, foram quantificados, 166,45±4,00 mg de equivalentes de ácido cafeico/g de extrato, valores significativamente superiores aos obtidos nos extratos das restantes cultivares. Seguem-se as cultivares Cobrançosa (152,76±3,44) e Picual (147,58±9,59), apresentando a cultivar Galega vulgar o teor mais baixo em fenóis totais (135,94±4,01).

Existem diversos autores que efetuaram determinações semelhantes do teor em fenóis totais em folhas de oliveira. Torna-se, difícil fazer comparações entre os dados obtidos e os presentes na bibliografia, uma vez que a grande maioria dos autores usou como padrão de comparação o ácido gálico ou ácido tânico, ao contrário do ácido cafeico. No entanto e, reportando-nos à afirmação de Silva et al. (2006), que refere que quer o ácido gálico, quer o ácido cafeico apresentam respostas semelhantes, usando o método de Folin-Ciocalteau, o que nos permitirá uma comparação aproximada de resultados.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram uma variação do teor em fenóis em folhas de oliveira, já demonstrada em trabalhos anteriores. Assim, vários autores verificaram diferenças significativas no teor de fenóis totais, entre folhas de oliveira de diferentes cultivares. Os resultados de Scognamiglio et al. (2012), na avaliação da atividade antioxidante de folhas de cultivares italianas de oliveira, indicam uma variação considerável no teor de fenóis totais, variando entre 330 mg de equivalentes de ácido gálico (mg GAE) por grama de folha seca, na cultivar Sallela, até um mínimo de 68,4 mg/g de equivalentes de ácido gálico na cultivar FS-17. Do mesmo modo, Giannakopoulou et al. (2010), obtiveram também valores de fenóis totais díspares, quando comparando as cultivares ‘Kalamata’ (de 1,92 a 3 mg GAE/g folha seca) e Konservolia (de 1,9 a 2,51 mg GAE/g folha seca), ou Silva et al. (2006), que detetaram teores de fenóis totais entre 11,6 e 40,1 g de fenóis/kg de folhas, dependendo da cultivar.

Variações do teor em fenóis totais também podem ser observadas quando se alteram as condições de extração. Abaza et al. (2011) refere que a extração a frio, usando água destilada, é uma forma de extração com pouco rendimento, obtendo teores em fenóis totais correspondendo a apenas 70% (16,52±0,62 mg GAE por grama de matéria seca) do obtido com extrações com outros solventes (metanol, etanol e acetona).

Resultados semelhantes foram apresentados por Kontogianni e Gerothanassis (2012), quando compararam extrações efetuadas com clorofórmio ou acetato de etilo, variando o teor em fenóis entre 105,7±12,6 mg GAE/g extrato seco, a 298,2±22,8 mg GAE/g de extrato seco, respetivamente. No entanto, estes valores referem-se a folhas secas ao ar, durante uma semana, obtendo-se uma diferença maior, quando os extratos foram preparados a partir de folhas seca em estufa. Neste caso, os teores em fenóis totais foram de 68,9±8,6 mg GAE/g extrato seco nos extratos de clorofórmio, e de 483,1±29,2 mg GAE/g extrato seco, para os extratos de acetato de etilo. De referir que estes valores ultrapassam, em grande medida, os valores máximos teóricos referidos por Mylonaki et al. (2008). Estes autores referem um valor máximo de fenóis totais de 250,2±76.8 mg GAE/g de matéria seca, extraídas com condições ótimas para a extração de fenóis de folhas de oliveira. Outros autores referem valores de fenóis totais de 144 g GAE/kg extrato (mg/g) (Skerget et al., 2005), 160±2,9 mg GAE/100 g extrato seco (Hayes et al., 2011), de 1,4 a 2,32 g GAE/100g matéria seca (Boudhrioua et al., 2009), 148 mg/g TAE (Lee et al., 2009), 10,11 a 61,66 mg GAE/g folha seca (Bilgin e Sahin, 2013), 5,3±0,056 mg GAE/g extrato a 12,7±0,040 mg GAE/g extrato (Ferreira et al., 2007).

4.1.2. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante, usando um dos métodos mais frequentes, o efeito bloqueador de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), demonstrou, mais uma vez, diferenças significativas entre cultivares (Quadro 1 e Figura 9).

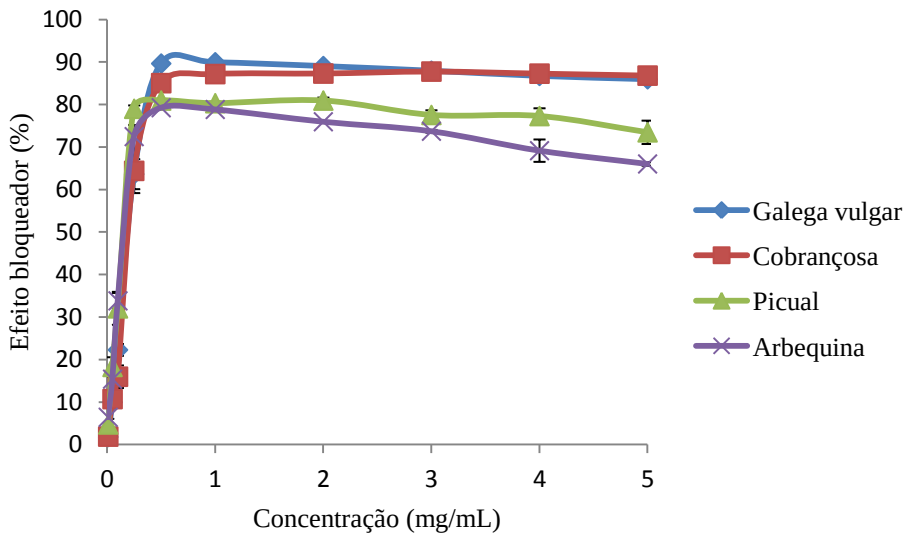


Figura 9 – Valores do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (%) obtidos para extratos de folhas de diferentes cultivares de oliveira (média±dp, n=6).

Apesar de os extratos das quatro cultivares apresentarem comportamento similar entre si (Figura 9), com uma relação concentração/atividade, e um aumento significativo da capacidade bloqueadora de radicais de DPPH até à concentração de extrato de 0,5 mg/mL, seguida de uma estabilização/redução dessa mesma capacidade, foram detetadas diferenças significativas (p <0,001) nos valores de EC_{50} entre cultivares (Quadro 2). O extrato que apresentou maior efeito bloqueador foi o extrato da cultivar Picual, com o valor de EC_{50} mais baixo (0,154 ± 0,019 mg extrato/mL). Um valor semelhante de EC_{50} foi obtido com a cultivar Arbequina (0,164±0,020 mg extrato/mL), sendo que as restantes cultivares, Galega vulgar e Cobrançosa, apresentaram os valores mais elevados de EC_{50}, sendo estes respetivamente 0,204±0,024 e 0,210±0,027 mg extrato/mL.

Do mesmo modo que se verificam variações do teor em fenóis totais, dependendo da cultivar em estudo e dos métodos de extração aplicados, também nos valores de EC_{50} a influência destes parâmetros é visível em vários trabalhos publicados anteriormente. No entanto, os valores de EC_{50} referidos na literatura são semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Os resultados de Scognamiglio et al. (2012) ilustram bem a influência da cultivar neste parâmetro, com valores de EC_{50} a variar entre 36,3±3 µg/mL, na cultivar "Rotondella" e 193,3 µg/mL na cultivar FS-17. Outro exemplo para as variações causadas pela cultivar, na atividade antioxidante medida pelo método do DPPH, é-nos demonstrado pelo trabalho de Giannakopoulou et al. (2010), com as

cultivares “Kalamata” e “Konservolia”, apesar destes autores não terem encontrado diferenças significativas entre as cultivares.

Quando se efetuam modificações nos métodos de extração, também se verificam variações nos valores de atividade antioxidante, medidas pelo valor de EC_{50} do método de DPPH. No entanto, os valores referidos na bibliografia mantêm-se semelhantes aos do presente trabalho. Assim, valores de EC_{50} entre 0,17 mg extrato/mL e 0,97 mg extrato/ml foram obtidos com extrações usando 80% de metanol e água destilada a temperatura ambiente, respetivamente (Abaza et al., 2011). Kontogianni e Gerothanassis (2012) também demonstraram que o uso de extratos obtidos com clorofórmio ou acetato de etilo, usando folhas secas em estufa, resulta também em valores diferentes de EC_{50}, variando entre 126,3±9,5 µg/mL, no primeiro caso e a 30,2±3,8 µg/mL, no caso dos extratos de acetato de etilo. Valores semelhantes de atividade antioxidante foram também reportados por Ferreira et al. (2007), com valores de EC_{50} que variaram entre 0,91 mg/mL a 2,32 mg/mL, para folhas da cultivar Cobrançosa, sujeita a diferentes aplicações de produtos à base de cobre usados na proteção contra doenças da oliveira.

No presente trabalho, e contrariamente ao observado em trabalhos de outros autores, não foi estabelecida correlação com significado estatístico ($p > 0,05$) entre o teor em fenóis e a atividade antioxidante, em nenhuma das cultivares em estudo. Como referido anteriormente, uma maior capacidade bloqueadora de radicais de DPPH foi obtida quando foram usados extratos da cultivar Picual, que apresentou o valor mais baixo de EC_{50} de 0,154±0,019 mg extrato/mL (Quadro 2).

Vários autores, como Silva et al. (2006), Ferreira et al. (2007), Lee et al. (2009), Giannakopoulou et al. (2010), Abaza et al (2011) ou Brahmi et al. (2013), sugerem uma forte correlação negativa entre o teor em fenóis totais e os valores de EC_{50}, no método da avaliação efeito bloqueador de radicais livres de DPPH. Apesar disso, outros trabalhos referentes a extratos de folha de oliveira não obtiveram correlações entre o teor em fenóis e efeito bloqueador de radicais de DPPH, como apresentado em Scognamiglio et al. (2012), existindo também na bibliografia outros resultados que demonstram a não existência de uma correlação entre o teor em fenóis totais e os valores de EC_{50} deste método (Yu et al., 2002; Othman et al., 2007; Reynertson et al., 2008).

4.1.3. Determinação do Poder redutor

Relativamente ao poder redutor dos extratos das folhas estudadas, verificou-se uma vez mais uma relação entre a concentração de extrato e a sua atividade antioxidante (Figura 10 e Quadro 2).

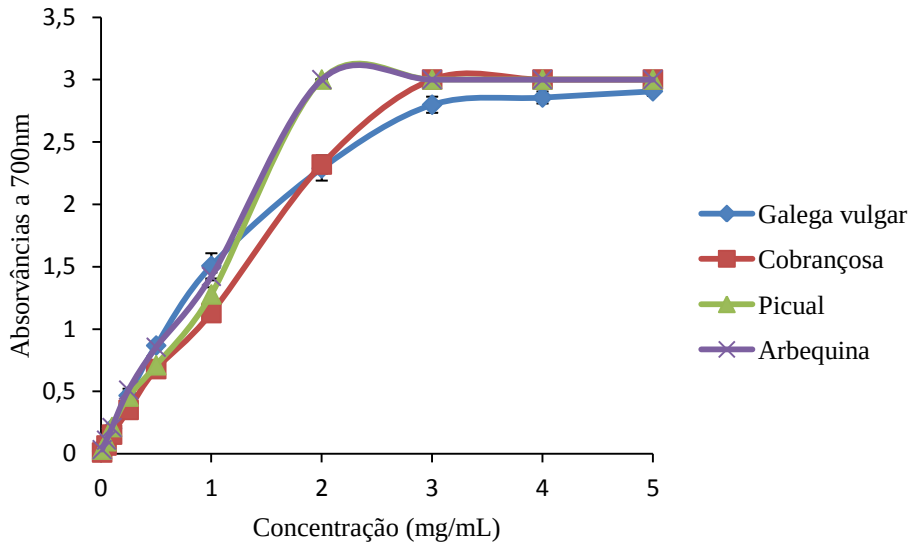


Figura 10 – Valores de absorvância a 700 nm determinados no ensaio do poder redutor para extratos de folhas de diferentes cultivares de oliveira (média±dp, n=6).

Observou-se um aumento constante dos valores de absorvância lidos a 700nm, até à concentração de 2 mg de extrato/mL, momento a partir do qual os valores obtidos estabilizam. De forma idêntica ao ensaio do radical DPPH, foram também detetadas diferenças significativas (p <0.01) nos valores de EC_{50} calculados para o poder redutor (Quadro 2), mas não correlações entre teor de fenóis e o poder redutor (p> 0,05).

Assim, os melhores resultados, expressos num valor mais baixo de EC_{50}, foram observados quando se usou os extratos da cultivar Arbequina (0,240±0,020 mg extrato/mL), valor significativamente mais baixo do que os obtidos usando folhas das outras cultivares. As restantes cultivares apresentaram valores superiores de EC_{50}, sendo que os extratos das folhas de Galega vulgar e Picual apresentaram valores de EC_{50} semelhantes entre si, de 0,271±0,010 e 0,293±0,007 mg extrato/mL, respetivamente.

Resultados mais baixos foram obtidos quando usados extratos de folhas da cultivar Cobrançosa, que necessitavam de uma concentração de extrato de 0,366±0,021 mg extrato/mL, para obterem o valor de EC_{50}.

Os presentes resultados mostraram ser mais promissores, quando comparados com alguns existentes na bibliografia. Para extratos de folha da cultivar Cobrançosa, Ferreira et al. (2007) obtiveram valores de EC_{50} para o ensaio do poder redutor, variáveis entre 1,17mg/mL e 2,91mg/mL muito superiores aos registados no presente trabalho.

Resultados semelhantes de valores de EC_{50}, relativamente aos do presente trabalho, foram obtidos por Orak et al. (2012) os quais indicam valores de 180µg/mL, mostrando também, mais uma vez, a influência da cultivar neste parâmetro. Outros autores, apesar de recorrerem a um método de avaliação do poder redutor distinto do realizado neste trabalho, comprovam, através dos seus resultados, a forte capacidade antioxidante de extratos de folhas de oliveira (Makris et al., 2007; Abaza et al., 2011; Salah et al., 2012; Ahmad-Qasem et al., 2013a; Ahmad-Qasem et al., 2013b).

4.1.4. Caraterização fitoquímica das folhas de oliveira recorrendo à RMN ^{1}H

O perfil RMN ^{1}H do extrato de folhas da cultivar Arbequina caraterizou-se pela presença de oito compostos de três classes diferentes (Figura 11): dois açúcares, a glucose e a sacarose; um secoiridóide, a oleuropeína; seis compostos fenólicos, a luteolina-4'-*O*-glucósido, a luteolina, o hidroxitirosol acetato, o hidroxitirosol e a luteolina-7-*O*-glucósido.

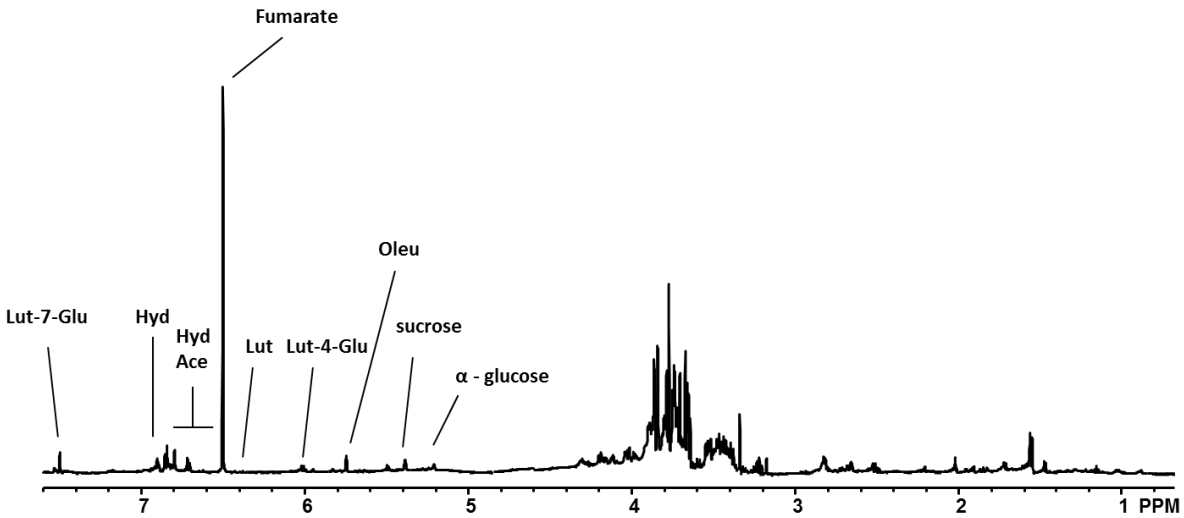


Figura 11 - Espetro RMN ^{1}H do extrato de folhas da cultivar Arbequina. Oleu – oleuropeína; Lut-4-Glu - luteolina-4'-*O*-glucósido; Lut – luteolina; Hyd Ace - hidroxitirosol acetato; Hyd – hidroxitirosol; Lut-7-Glu - luteolina-7-*O*-glucósido.

4.2. Influência da adição de extratos de folhas de oliveira no processo oxidativo

4.2.1. Quantificação dos fenóis totais

Após a adição do extrato de folha de oliveira, à manteiga e margarina, foram quantificados os fenóis totais (Figura 12).

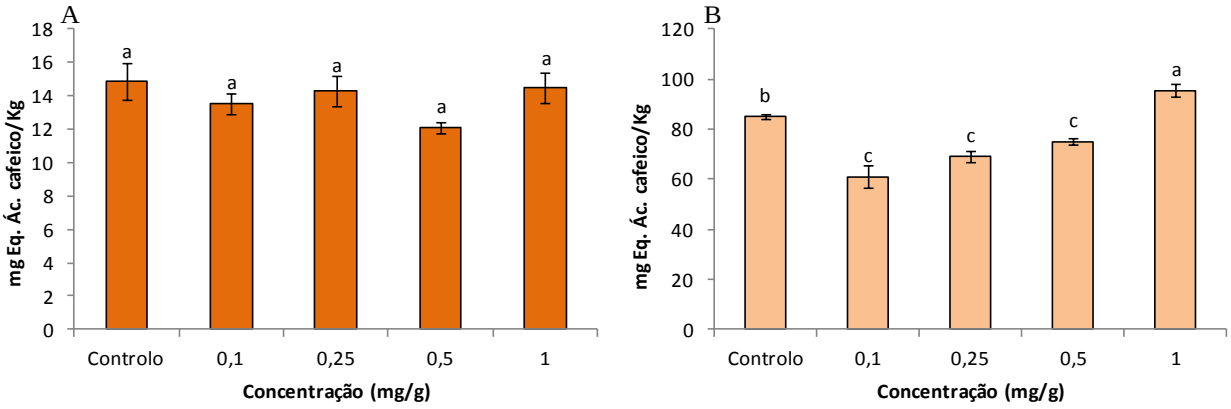


Figura 12 – Valores médios do teor em fenóis totais de manteiga (A) e margarina (B), com adição de diferentes concentrações de extrato de folha de oliveira. Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$) (média±dp, n=10).

Relativamente à manteiga, a adição de extrato de folha de oliveira mostrou não aumentar significativamente o teor em fenóis totais. Assim, na manteiga controlo foram determinados valores superiores destes compostos (14,85±3,42 mg de equivalentes de ácido cafeico/Kg amostra), mantendo-se em níveis semelhantes quando foi adicionado extrato. Os valores obtidos com a adição de extrato variaram entre 12,08±1,08 e 14,46±2,87 mg de equivalentes de ácido cafeico/Kg amostra, nas concentrações de extrato de 0,5 e 1 mg extrato/g, respetivamente (Figura 12A). Não foi detetada qualquer correlação entre a concentração de extrato adicionada e o teor em fenóis ($p = 0,4105$).

Os resultados que dizem respeito à adição de extratos de folhas à margarina mostraram variações significativas no teor de fenóis totais (Figura 12B). Quando avaliada apenas a margarina, sem adição de extrato de folha, o teor de fenóis totais foi de 85,11±4,33 mg de equivalentes de ácido cafeico/Kg amostra. A adição de extrato de folha a uma concentração de 1 mg/g resultou num aumento significativo do teor em fenóis totais detetados, atingindo um valor de 95,51±7,58 mg de equivalentes de ácido cafeico/Kg amostra, sendo este o valor quantificado mais elevado. Quando adicionado extrato de folhas nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5 mg de extrato/g foi observado um decréscimo relativamente ao teor em fenóis detetados no controlo. Nestas três

concentrações de extrato, os valores não diferiram significativamente entre si, variando entre 61,10±14,44, 69,12±6,50 e 75,21±3,88 mg de equivalentes de ácido cafeico/Kg amostra, respetivamente para as concentrações 0,1; 0,25 e 0,5 mg extrato/g. Os resultados mostraram uma ligeira correlação positiva (p = 0,01; R^2 = 0,1179) entre a adição de extrato e o teor em fenóis, apesar de aparentemente esta não existir, o que estará relacionado com o aumento para a classe de adição mais elevada, e com o número de repetições efetuadas.

A quase inexistência de dados disponíveis, no que diz respeito a bibliografia, relativamente a teor em fenóis totais, quer de manteiga, quer de margarina, torna difícil a comparação dos nossos resultados. No entanto, alguns autores referem a existência de 0,187 mg/100 g (Puravankara et al., 2000) ou 0,32 mg/100 g de fenóis totais em manteiga de búfala. Assim, no caso da manteiga, os valores obtidos no presente trabalho são consideravelmente mais elevados, (14,85 mg/100 g), estando provavelmente esta diferença relacionada com a origem do leite, já que o leite de búfala apresenta um teor em fenóis de 3,0±0,2 mg GAE/100g (Sreeramulu e Raghunath, 2011) enquanto o leite de vaca apresenta teores entre 800-1000 mg GAE/L (Tavares et al., 2011).

Relativamente aos valores obtidos no ensaio com a margarina, apenas foram encontrados na bibliografia teores em fenóis totais em manteiga de carité (gordura vegetal) que apresenta valores compreendidos entre aproximadamente 60 a 130 ppm de fenóis totais (Maranz et al., 2003), semelhantes aos obtidos no presente trabalho (85,11±4,33 ppm).

No que diz respeito à adição de extratos/teor em compostos fenólicos a amostras de manteiga e margarina, os dados existentes são escassos. Os resultados disponíveis, de Puravankara et al. (2000) e Mehta (2006) mostraram um aumento do teor em fenóis totais em manteiga de búfala com a adição de extratos ricos em fenóis, apesar de este aumento não ser proporcional à concentração de extrato.

4.2.2. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Os valores obtidos na determinação do efeito bloqueador de radicais de DPPH nas diferentes concentrações de adição de extrato e controlo encontram-se na Figura 13. Pela análise da figura constata-se que nas mesmas condições experimentais o efeito bloqueador da margarina é mais de três vezes superior ao da manteiga. Este fato estará com certeza relacionado com a natureza da gordura existente nas duas preparações. A

manteiga é de origem animal, sendo uma gordura rica em ácidos gordos saturados com menor resistência à oxidação, enquanto que a margarina é feita com uma gordura de origem vegetal, com toda a certeza com um maior teor em ácidos gordos monoinsaturados e com um teor de antioxidantes também superior. As gorduras de origem vegetal utilizadas para a preparação de margarinas são ricas em tocoferóis que são compostos com atividade antioxidante reconhecida, para além dos antioxidantes que são adicionados como conservantes, mas esses serão muito semelhantes em ambas as preparações pelo que a sua interferência deverá ser semelhante.

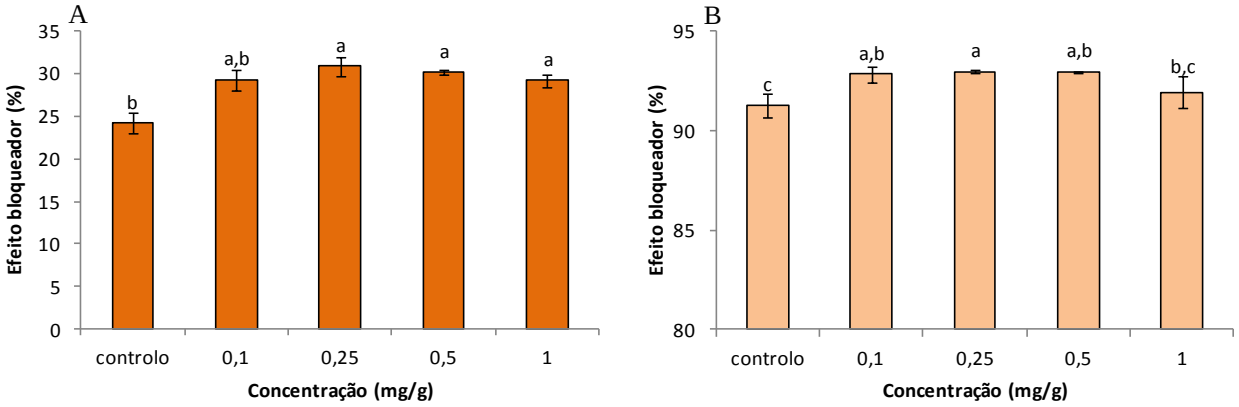


Figura 13 – Valores médios de efeito bloqueador de radicais de DPPH da manteiga (A) e margarina (B), com adição de diferentes concentrações de extrato de folha de oliveira. Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$) (média±dp, n=10).

Para o caso da manteiga, a adição de extrato de folha de oliveira, independentemente da concentração utilizada, mostrou exercer um efeito positivo neste parâmetro (Figura 13A). A manteiga, quando testada sem a adição de extrato de folha, resultou num efeito bloqueador de 24,21±3,69%, sendo este o valor mais baixo detetado. Após a adição de extrato de folha, a capacidade bloqueadora aumentou significativamente, particularmente nas concentrações de 0,25 mg/g e acima desta. Na concentração de 0,1 mg/g o efeito bloqueador atingiu 29,26±4,06%, valor que, apesar de mais elevado, não é significativamente diferente do obtido no ensaio controlo. Nas concentrações mais elevadas de extrato adicionado (0,25; 0,5 e 1 mg extrato/g), o efeito bloqueador detetado foi semelhante, atingindo o máximo de atividade antioxidante (30,87±3,64%) na concentração de 0,25mg/g. Nas duas concentrações restantes (0,5 e 1 mg/g), a atividade antioxidante detetada foi ligeiramente mais baixa, sendo, respetivamente, de 30,14±0,98 e 29,17±2,40%. Os resultados da capacidade

bloqueadora de radicais de DPPH mostraram estar correlacionados com a concentração de extrato adicionada (p = 0,004; R^2 = 0,1608), mas não com o teor em fenóis totais detetados (p = 0,9287).

Relativamente aos resultados da capacidade bloqueadora de radicais de DPPH utilizando a margarina, os resultados apresentaram um comportamento semelhante aos obtidos com a manteiga (valor mais elevado usando margarina com adição de 0,25 mg/g de extrato e valor mais baixo no ensaio controlo), mas com percentagens elevadas de bloqueio de radicais livres (Figura 13B). Assim, no ensaio controlo, foi detetada uma capacidade de bloquear radicais de DPPH de 91,27±0,53%, valor este estatisticamente diferente dos obtidos com a adição de extrato, exceto no caso da margarina com 1mg/g de extrato, que obteve o valor mais baixo, nas situações em que se testou a adição de extrato de folhas (91,94±0,73%). Como referido anteriormente, uma maior capacidade bloqueadora de radicais foi detetada usando margarina com adição de 0,25mg/g de extrato de folha (92,97±0,09%), seguido da concentração de 0,5 mg/g, com valor virtualmente igual (92,96±0,04%) e da concentração de 0,1 mg/g, com a capacidade de bloquear 92,83±0,34%. De referir também que estes valores não diferem significativamente entre si (p> 0,05). Os resultados do ensaio do DPPH não mostraram estar correlacionados com a adição de extrato (p = 0,5170), mas sim com o teor de fenóis (p <0,001; R^2 = 0,2858).

Curiosamente, e para concentração de 0,25mg/g, obtiveram-se os valores maiores de efeito bloqueador de DPPH, e para a maior concentração de extrato utilizada, 1mg/g, à qual corresponde valores mais elevados de fenóis totais, obtiveram-se, tanto para a manteiga como para a margarina, valores de efeito bloqueador de DPPH menores. Tal ocorrência deve-se ao fato de alguns compostos fenólicos poderem ter efeito pró-oxidante e suprimir a sua capacidade antioxidante, quando a concentração de extrato aumenta a certos níveis (Bhale et al., 2007).

4.2.3. Efeito sequestrante do radical Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfónico (ABTS•+)

Para uma melhor caracterização da capacidade antioxidante da manteiga e margarina, procedeu-se também à avaliação da inibição do radical ABTS, em comparação com um padrão de referência antioxidante, o Trolox. Os resultados relativos a este ensaio são apresentados na Figura 14.

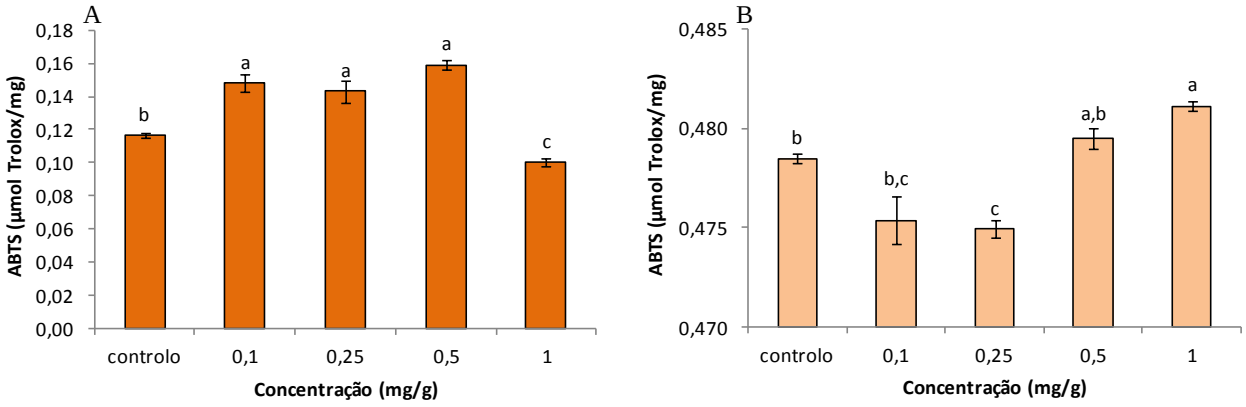


Figura 14 – Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS da manteiga (A) e margarina (B), com adição de diferentes concentrações de extrato de folha de oliveira. Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$) (média±dp, n=10).

Tal como o observado na avaliação da capacidade bloqueadora de radicais de DPPH, no ensaio da atividade sequestradora do radical ABTS, os resultados obtidos usando manteiga foram consideravelmente inferiores aos obtidos com a margarina.

Para a manteiga, os piores resultados foram, também eles, observados no ensaio controlo e na concentração mais elevada de extrato (1mg/g). Assim, na concentração mais elevada de extrato adicionado à manteiga (1mg/g) foi detetado o nível mais baixo de atividade sequestradora (0,100±0,01 µmol Trolox/mg), inferior ao observado no ensaio controlo (0,117±0,01 µmol Trolox/mg). É de referir também que estes dois valores são significativamente diferentes entre si, bem como os obtidos para as restantes concentrações. Nessas concentrações (0,1; 0,25 e 0,5 mg/g), os valores obtidos de equivalentes de Trolox são semelhantes entre eles, e variaram entre 0,159±0,01 µmol Trolox/mg na concentração de 0,5 mg/g, 0,148±0,01 µmol Trolox/mg na concentração de 0,1 mg/g e 0,143±0,02 µmol Trolox/mg, na concentração de 0,25 mg/g. Não foi possível obter nenhuma correlação entre a capacidade antioxidante medida com este método e as concentrações de extrato adicionadas às amostras (p = 0,3719), mas sim com o teor em fenóis encontrado nas amostras (p = 0,02; R^2 = 0,1075).

A análise dos resultados referentes ao ensaio com a margarina mostra que a atividade antioxidante, expressa em µmol Trolox/mg, foi mais baixa quando foi utilizada a concentração intermédia de extrato (0,25mg/g, com 0,474±0,01 µmol Trolox/mg). Valores muito semelhantes de atividade antioxidante foram obtidos na concentração de 0,1 mg/g (0,475±0,01 µmol Trolox/mg), não existindo diferenças significativas entre eles. No ensaio controlo, o valor obtido foi também ele semelhante (0,478±0,01 µmol Trolox/mg), valor estatisticamente idêntico ao registado com a concentração de 0,1mg/g, bem como com valor de atividade antioxidante verificado quando se utilizou a concentração de 0,5 mg/g (0,479±0,01 µmol Trolox/mg). Foi verificada uma maior capacidade antioxidante quando se utiliza margarina com a adição de 1mg/g de extrato. Nestas condições, foi obtido um valor de equivalente de Trolox de 0,481±0,01 µmol Trolox/mg, não sendo, no entanto, significativamente diferente do valor registado com o uso de 0,5mg/g de extrato. A capacidade bloqueadora de radicais de ABTS pelas amostras de margarina mostrou estar correlacionada quer com a concentração de extrato adicionada (p = 0,001; R^2 = 0,1909), quer com o teor em fenóis (p <0,001; R^2 = 0,2969).

Os resultados obtidos nos ensaios da capacidade antioxidante (DPPH e ABTS), com adição de extratos de folha de oliveira a amostras de manteiga e margarina, são difíceis de colocar em perspetiva, relativamente a outros, uma vez que existem poucos dados semelhantes na bibliografia para comparação. No entanto, Pawar et al. (2012), referem no seu trabalho que a adição de extratos aquosos ou metanólicos de *Pueraria tuberosa*, *Asparagus racemosus*, e *Withania somnifera* a manteiga clarificada ("ghee"), permite a manutenção dos níveis de capacidade bloqueadora de radicais de DPPH das amostras, mesmo após 21 dias em condições de oxidação. Por outro lado, as amostras sem a adição de extratos destas plantas demonstraram possuir uma capacidade antioxidante 75% inferior ao do início do ensaio. Nesse trabalho verificou-se que na manteiga sem extrato os valores (20,6%) não diferem muito dos valores do presente trabalho (24,21%). No que refere à adição de extrato de várias plantas, os valores variam entre os 25,6%, 33,7% e 58,7% dependendo da planta utilizada. De acordo com trabalho descrito por Lopes et al. (2014), no qual demonstrou que a adição de extratos de diferentes misturas de especiarias e ervas aromáticas aumenta a capacidade antioxidante de margarina, e que essa atividade antioxidante se correlacionava positivamente com o conteúdo em compostos fenólicos dessas mesmas especiarias,

passando de 34,26 e 35,89% (margarina sem sódio e margarina com sódio, respetivamente), para valores até 83,12%.

Existem vários estudos referindo-se à adição de folhas ou extratos de folhas de oliveira a óleos vegetais e os seus efeitos na qualidade e estabilidade oxidativa (Farag et al., 2003; Paiva-Martins et al., 2007; Salta et al., 2007; Bouaziz et al., 2008; Lafka et al., 2013; Malheiro et al., 2013a, b; Sevim et al., 2013). Estes estudos referem a elevada capacidade das folhas e seus extratos manterem ou aumentarem a estabilidade oxidativa desses óleos, bem como as suas características nutricionais e, em alguns casos, características de aparência para o consumidor.

Quando analisados os poucos dados existentes na bibliografia, sobre a adição de extratos de folhas e o seu efeito na atividade antioxidante, verifica-se que esta aumenta, com o acréscimo de extrato. Tal foi verificado por Chiou et al. (2009), quando adicionaram extratos de folhas de oliveira a diversos óleos vegetais (azeite, óleo de girassol e óleo de palma). No entanto, estes mesmos autores verificaram comportamentos diferentes usando óleos frescos ou após fritura, sendo no primeiro caso mais visíveis as diferenças entre valores de atividade antioxidante com e sem adição de extrato. De igual modo, e para azeite, a extração deste na presença de quantidades crescentes de folhas de oliveira permitiu, por um lado, aumentar a capacidade antioxidante das amostras, e, por outro lado, manter níveis mais elevados dessa atividade antioxidante, com o passar de tempo de armazenamento (Sevim et al., 2013). Os resultados obtidos por Malheiro et al. (2013a) também referem que a adição de extratos de folhas de oliveira mantém níveis mais elevados de atividade antioxidante de óleo de soja submetida a aquecimento por micro-ondas, quando comparado com óleo de soja sem adição de extrato e no tempo máximo de aquecimento testado no referido trabalho. No entanto, para tempos de aquecimento menores, a presença dos extratos levou a uma atividade antioxidante mais baixa do que a medida nas amostras controlo.

4.3. Determinação da cor

A determinação da cor foi efetuada em triplicado em cada uma das cinco placas avaliadas por concentração através, como referido anteriormente, do colorímetro Minolta CR-400. Optou-se pela recolha dos dados nos modos CIELAB e Hunter, avaliando-se as coordenadas L^*, a^* e b^* (CIELAB) e L, a e b (Hunter), sendo que L^* ou L corresponde à luminosidade (entre 0 para preto puro e 100 para branco puro), a^* ou a

ao conteúdo de vermelho a verde (valores positivos correspondem a vermelho, e valores negativos a verde), e b^* e b ao conteúdo de amarelo a azul (valores positivos correspondem a amarelos, e valores negativos a azuis).

Os resultados para a avaliação da cor, no início do ensaio de oxidação da margarina e manteiga, são mostrados nas tabelas que se seguem (Quadro 3 e 4). Como esperado, os parâmetros L^* e L apresentaram valores positivos, já que estes correspondem a valores elevados de luminosidade. Em relação aos valores de b^* e b estes são positivos, correspondendo à cor amarela da manteiga e margarina. Quanto aos valores de a^* ou a, estes foram negativos, no entanto relativamente próximos de 0, indicando uma certa neutralidade nos tons de verde e vermelho.

No quadro 3 mostram-se os resultados referentes ao ensaio usando manteiga. Assim, foi observada uma redução da luminosidade das amostras com a adição do extrato, sendo maior quanto maior a concentração de extrato adicionada. Observaram-se diferenças significativas entre o ensaio controlo e as amostras com a adição da concentração mais elevada de extrato (1mg/g), no início do ensaio e no final (10 dias) sendo que aos 5 dias de exposição à oxidação, os valores obtidos no controlo não diferiram significativamente dos registados nas amostras contendo extrato de folha de oliveira. É também motivo de referência, o fato de se terem detetado, em algumas situações, aumentos de luminosidade com a adição de extrato, nomeadamente no início do ensaio, nas concentrações de 0,1 e 0,25 mg/g, aos 5 dias de ensaio, na concentração de 0,25 mg/g, e após 10 dias, nesta mesma concentração. No entanto, em nenhuma destas situações se verificaram diferenças significativas entre amostras com e sem adição de extrato.

No geral, os resultados mostraram uma descida no parâmetro L^* /L. Em todas estas situações, em que é visível um decréscimo da luminosidade com a adição de extrato, deve-se, muito provavelmente, à adição deste, já que possuía uma coloração acastanhada (Quadro 3).

Quadro 3 – Valores médios dos parâmetros L, a, b e L^*, a^*, b^* determinados na manteiga, sem e com adição de extrato de folhas de oliveira (média±dp, n=15).

Concentração	**Hunter**			**CIELAB**		
0 dias	**L**	**a**	**b**	**L***	**a***	**b***
Controlo	78,35 ± 0,41 a	-4,17 ± 0,26 c	23,79 ± 0,51 a	82,59 ± 0,34 a	-4,35 ± 0,28 c	29,33 ± 0,69 a
0,1	78,41 ± 0,40 a	-3,63 ± 0,28 a	23,72 ± 0,79 a	82,64 ± 0,33 a	-3,78 ± 0,29 a	29,22 ± 1,11 a
0,25	78,41 ± 0,42 a	-3,74 ± 0,21 a,b	23,63 ± 0,59 a	82,64 ± 0,35 a	-3,90 ± 0,22 a,b	29,08 ± 0,85 a
0,5	77,96 ± 0,38 a	-3,92 ± 0,17 b	23,95 ± 0,38 a	82,26 ± 0,32 a	-4,10 ± 0,18 b	29,66 ± 0,59 a
1	77,42 ± 0,61 b	-3,75 ± 0,18 a,b	23,70 ± 0,64 a	81,80 ± 0,52 b	-3,93 ± 0,19 a,b	29,39 ± 0,91 a
Valor *p*	<0,001*	<0,001*	0,647*	<0,001*	<0,001*	0,433*
5 dias	**L**	**a**	**b**	**L***	**a***	**b***
Controlo	72,19 ± 0,81 a,b	-5,15 ± 0,11 d	26,60 ± 0,61 a	77,35 ± 0,70 a,b	-5,54 ± 0,13 d	35,51 ± 1,19 a
0,1	71,46 ±0,87 b	-4,94 ± 0,14 c	26,17 ± 0,61 a	76,72 ± 0,76 b	-5,33 ± 0,16 c	34,96 ± 1,15 a
0,25	72,61 ± 0,93 a	-4,75 ± 0,19 b	26,58 ± 0,82 a	77,71 ± 0,81 a	-5,10 ± 0,20 b	35,33 ± 1,57 a
0,5	72,13 ± 0,50 a,b	-4,49 ± 0,29 b	26,19 ± 0,75 a	77,30 ± 0,43 a,b	-4,83 ± 0,32 b	34,77 ± 1,36 a
1	71,42 ± 0,85 b	-3,95 ± 0,15 a	25,95 ± 0,59 a	76,68 ± 0,74 b	-4,26 ± 0,16 a	34,49 ± 1,16 a
Valor *p*	<0,001*	<0,001**	0,053*	<0,001*	<0,001**	0,201*
10 dias	**L**	**a**	**b**	**L***	**a***	**b***
Controlo	70,48 ± 0,59 a	-5,29 ± 0,15 c	25,28 ± 0,53 a	75,87 ± 0,51 a	-5,75 ± 0,18 c	33,69 ± 0,79 a
0,1	69,86 ± 1,9 a,b	-5,05 ± 0,30 c	24,26 ± 0,97 b,c	75,33 ± 1,66 a,b,c	-5,50 ± 0,34 c	32,14 ± 1,44 b,c
0,25	70,64 ± 0,92 a	-4,73 ± 0,22 b	25,27 ± 0,46 a	76,00 ± 0,80 a	-5,12 ± 0,24 b	33,63 ± 0,66 a
0,5	69,49 ± 0,87 b	-4,43 ± 0,38 b	24,91 ± 0,74 a,b	75,00 ± 0,76 b	-4,82 ± 0,40 b	33,36 ± 1,07 a,b
1	68,27 ± 1,08 b	-3,61 ± 0,17 a	23,99 ± 0,49 c	73,94 ± 0,95 c	-3,94 ± 0,19 a	32,13 ± 0,56 c
Valor *p*	<0,001**	<0,001**	<0,001*	<0,001**	<0,001**	<0,001**

As médias dentro de uma coluna com letras diferentes diferem significativamente entre si (p <0,05).

*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA *one-way* após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,05) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.

**Os valores de p foram calculados a partir da Análise *one-way* Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,05) foi aplicado o teste de Dunnett T3's.

Relativamente aos resultados da cor, usando a margarina, com e sem a adição de extrato de folhas de oliveira, nos diversos tempos de oxidação, estes são apresentados na Quadro 4. Relativamente ao parâmetro L^* e L, em todas as situações observou-se um decréscimo, comparando o ensaio controlo, com os ensaios em que se incorporou extrato à margarina. Assim, e relativamente à luminosidade, foram detetadas variações negativas e diferenças significativas entre os ensaios controlo e o ensaio com a concentração mais elevada de extrato (1mg/g), em todos os tempos de oxidação. Para além disso, aos 5 dias de oxidação, os resultados deste parâmetro são significativamente diferentes, quando se compara o ensaio controlo a qualquer uma das concentrações de extrato adicionadas. De referir também as diferenças significativas registadas entre o ensaio controlo e a margarina com adição de 0,1mg/g de extrato. Nas restantes situações verificou-se também uma redução da luminosidade da margarina, apesar da variação detetada não ter sido significativa. Existiu contudo, uma situação em que se verificou um aumento de luminosidade relativamente ao controlo, aos 10 dias de oxidação, nas placas com adição de 0,1 mg de extrato por grama de margarina, não sendo contudo significativa.

Quadro 4 – Valores médios dos parâmetros L, a, b e L^*, a^*, b^* determinados na margarina, sem e com adição de extrato de folhas de oliveira (média±dp, n=15).

Concentração	Hunter			CIELAB		
0 dias	**L**	**a**	**b**	**L***	**a***	**b***
Controlo	83,12 ± 0,53 a	-2,45 ± 0,11 a,b	25,18 ± 0,32 a	86,55 ± 0,44 a	-2,49 ± 0,11 a,b	30,42 ± 0,41 a
0,1	82,16 ± 0,61 b	-2,34 ± 0,11 a	24,75 ± 0,94 a,b	85,76 ± 0,50 b	-2,40 ± 0,11 a	29,99 ± 1,30 a,b
0,25	82,71 ± 1,10 a,b	-2,41 ± 0,13 a	25,24 ± 0,67 a,b	86,20 ± 0,90 a,b	-2,46 ± 0,14 a,b	30,60 ± 0,79 a
0,5	82,62 ± 0,40 a,b	-2,42 ± 0,13 a,b	24,76 ± 0,19 b	86,14 ± 0,33 a,b	-2,47 ± 0,13 a,b	29,91 ± 0,27 b
1	82,30 ±0,55 b	-2,53 ± 0,09 b	24,83 ± 0,46 a,b	85,87 ± 0,45 b	-2,59 ± 0,09 b	30,08 ± 0,58 a,b
Valor *p*	<0,001**	<0,001*	<0,001**	<0,001**	<0,001*	<0,001**
5 dias	**L**	**a**	**b**	**L***	**a***	**b***
Controlo	75,78 ± 0,52 a	-2,90 ± 0,24 b	32,50 ± 0,82 b	80,41 ± 0,44 a	-3,05 ± 0,25 b	45,05 ± 1,86 c
0,1	71,39 ± 1,13 d	-2,22 ± 073 a	35,73 ± 2,17 a	76,66 ± 0,98 d	-2,38 ± 0,78 a	54,87 ± 5,32 a
0,25	73,72 ± 0,85 b,c	-2,14 ± 0,39 a	33,84 ± 1,39 b	78,67 ± 0,73 b,c	-2,27 ± 0,42 a	48,89 ± 3,44 b
0,5	74,54 ± 0,63 b	-2,42 ± 0,31 a	33,88 ± 1,06 b	79,36 ± 0,53 b	-2,56 ± 0,32 a	48,49 ± 2,54 b,c
1	73,03 ± 0,88 c	-2,22 ± 0,27 a	33,91 ± 1,30 b	78,07 ± 0,76 c	-2,36 ± 0,28 a	49,44 ± 3,41 b
Valor *p*	<0,001**	<0,001**	<0,001*	<0,001**	<0,001**	<0,001*
10 dias	**L**	**a**	**b**	**L***	**a***	**b***
Controlo	70,72 ± 2,12 a,b	-2,18 ± 0,68 c,d	34,33 ± 1,41 a	76,07 ± 1,84 a,b	-2,34 ± 0,72 c,d	51,91 ± 4,21 a
0,1	71,72 ± 1,17 a	-2,31 ± 0,55 d	34,43 ± 1,34 a	76,94 ± 1,01 a	-2,47 ± 0,59 d	51,38 ± 3,30 a
0,25	69,50 ± 1,69 b,c	-1,54 ± 0,66 b,c	34,89 ± 0,95 a	75,01 ± 1,48 b,c	-1,66 ± 0,70 b,c	53,91 ± 2,16 a
0,5	69,22 ± 1,59 b,c	-1,29 ± 0,72 a,b	34,70 ± 1,35 a	74,76 ± 1,39 b,c	-1,39 ± 0,78 a,b	53,71 ± 3,22 a
1	68,07 ± 1,67 c	-0,85 ± 0,70 a	33,77 ± 0,87 a	73,76 ± 1,46 c	-0,92 ± 0,75 a	52,14 ± 1,86 a
Valor *p*	<0,001*	<0,001*	0,120*	<0,001*	<0,001*	0,098*

As médias dentro de uma coluna com letras diferentes diferem significativamente entre si (p <0,05).
*Os valores de p foram calculados a partir da Análise ANOVA *one-way* após se ter verificado os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,05) foi aplicado o teste post-hoc de Tukey.
**Os valores de p foram calculados a partir da Análise *one-way* Welch, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias. Quando se observou um efeito significativo (p<0,05) foi aplicado o teste de Dunnett T3's.

Relativamente aos resultados da coordenada a^*/ a, no ensaio com a manteiga, verificou-se uma descida desta coordenada com o aumento do tempo de oxidação, quer no ensaio controlo, quer no ensaio com as amostras contendo extrato. Por outro lado, a adição de extrato em todas as concentrações resultou num aumento dos valores desta coordenada em relação ao controlo, com a exceção das amostras contendo 1mg/g de extrato, aos 10 dias de ensaio. Salienta-se também que, nas duas primeiras medições, realizadas no início do ensaio, e aos 5 dias de oxidação, os valores obtidos na amostra controlo são inferiores e significativamente diferentes dos obtidos com as amostras contendo extrato. No final do ensaio, quer as amostras controlo, quer as amostras contendo 0,1mg/g de extrato, apresentaram valores inferiores e significativamente diferentes, dos obtidos nas restantes amostras.

No ensaio com a margarina, o comportamento das amostras diferiu do que foi observado no ensaio realizado com a manteiga. Puderam verificar-se três tendências principais: a primeira, indica uma diminuição dos valores desta coordenada entre o ensaio sem adição de extrato e a adição de 1mg/g de extrato, no início do ensaio (0 dias), apesar do aumento verificado nas concentrações intermédias; a segunda, uma diminuição dos valores nas placas controlo, entre o início do ensaio e os 5 dias de oxidação, e um aumento nas restantes concentrações; a terceira, um aumento considerável desta coordenada aos 10 dias de exposição à oxidação, mais evidente nas amostras contendo as concentrações mais elevadas de extrato (0,25, 0,5 e 1mg/g). Pôde verificar-se também o fato de, na medição deste parâmetro, no início do ensaio (0 dias), não se verificaram diferenças significativas entre as amostras controlo e as restantes, sendo que aos 5 dias de oxidação, os valores obtidos nas amostras controlo diferiram significativamente das amostras com a adição de extrato, e no final do processo de oxidação (10 dias), foram as amostras contendo 1mg/g de extrato que apresentaram valores significativamente diferentes das restantes.

Considerando a coordenada b^* /b, que nos indica o conteúdo em amarelo (valores positivos) e azul (valores negativos), os resultados, como expectável, indicam a cor amarela das amostras. Nas amostras de manteiga, a coordenada b^* /b apresentou um aumento entre o início do ensaio e os 5 dias de oxidação, atingindo aí valores mais elevados, no entanto, após esse período os valores decresceram, para valores intermédios, no final dos 10 dias de oxidação. Não foi verificado qualquer efeito da adição dos extratos de folhas à manteiga, quer na primeira leitura, no início do ensaio, quer após a passagem do 5º dia de oxidação, já que os valores não apresentaram

diferenças significativas. Os valores registados ao 10º dia de ensaio mostram que a adição de extratos levou a uma redução desta coordenada, relativamente às amostras controlo.

Nas amostras de margarina, a adição de diferentes quantidades de extrato parece não afetar esta coordenada. Os resultados mostram que os valores obtidos, quer nas amostras controlo, quer nas amostras com extrato, são muito semelhantes, tendo sido apenas detetadas diferenças significativas entre as amostras controlo e amostras contendo 0,5mg/g de extrato, no início do ensaio, e entre as amostras controlo e amostras contendo 0,1mg/g de extrato, aos 5 dias de oxidação. Com o aumento do tempo de oxidação, verificou-se um aumento dos valores desta coordenada, quer nas amostras controlo, quer naquelas que continham extrato de folhas de oliveira.

Nas amostras foi também avaliada a Variação de Cor (ΔE), comparando as coordenadas CIELAB L^*, a^* e b^*, entre o ensaio controlo (sem adição de extrato) e as amostras contendo extrato, recorrendo à fórmula descrita por Hunter (1973):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{\frac{1}{2}}$$

E foi avaliado o Índice de Amarelecimento (YI), nas mesmas condições de ensaio, através da seguinte fórmula de Francis e Clydesdale (1975):

$$YI = 142.86\, b^* / L^*$$

Os resultados referentes à avaliação da variação de cor (ΔE) e de índice de amarelecimento (YI) da manteiga são apresentados na Figura 15 e 16.

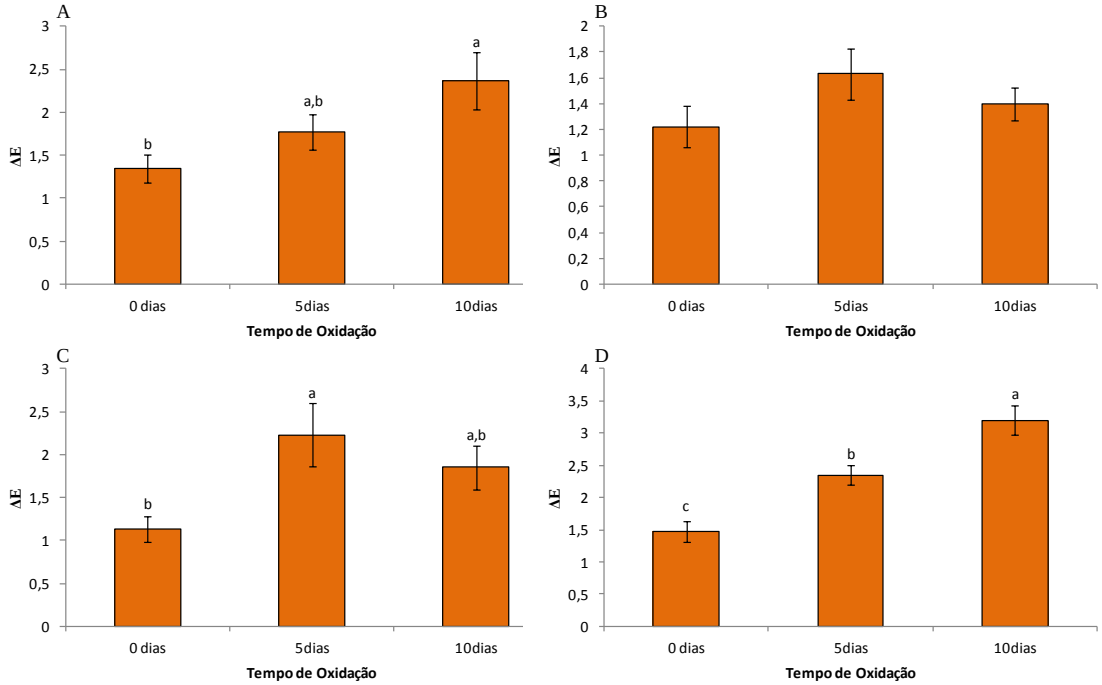


Figura 15 – Valores médios da variação de cor (ΔE) das amostras de manteiga com adição de extrato a diferentes concentrações: 0,1 mg/g (A), 0,25 mg/g (B), 0,5 mg/g (C) e 1 mg/g (D), relativamente ao ensaio controlo (sem adição de extrato). Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$), para dias diferentes de avaliação da oxidação. A ausência de letras indica a não existência de diferenças significativas (média±dp, n=15).

A adição de extrato de folhas de oliveira à manteiga resultou em valores positivos de variação de cor (ΔE), indicando mais uma vez o escurecimento que ocorreu nas referidas amostras. Os valores de variação de cor (ΔE) registados situaram-se entre 1,13 (0,5mg/g), 1,22 (0,25mg/g), 1,35 (0,1mg/g) e 1,47 (1mg/g), no início do ensaio (0 dias), sem existirem, porém, diferenças significativas entre eles. Os valores registados aos 5 dias de ensaio mostraram existir diferenças significativas entre o valor mais baixo, 1,63, na concentração de 0,25, e o valor mais alto, 2,35, na concentração de 1mg/g de extrato. No final do ensaio, as diferenças significativas registaram-se entre o valor mais alto (3,2), da concentração mais elevada (1mg/g) e os valores mais baixos (1,4 e 1,85), obtidos, respetivamente, nas concentrações de 0,25 e 0,5mg/g. A adição de concentrações crescentes de extrato não parece exercer muita influência sobre o valor de ΔE. Ou seja, no início do ensaio (0 dias), não se registaram diferenças significativas entre as concentrações de extrato adicionadas. Por outro lado, quando as diferenças registadas foram significativas, o comportamento das amostras não é consequente. Assim, aos 5 dias de ensaio, o valor mais elevado de ΔE foi registado na concentração

mais alta de extrato adicionada, sendo que, o valor mais baixo não foi obtido na concentração mais baixa de extrato (0,1mg/g), mas sim na seguinte (0,25mg/g). O mesmo sucedeu aos 10 dias de ensaio, onde se registou o valor mais alto de ΔE, na concentração mais elevada (1mg/g), e o valor mais baixo na concentração de 0,25mg/g.

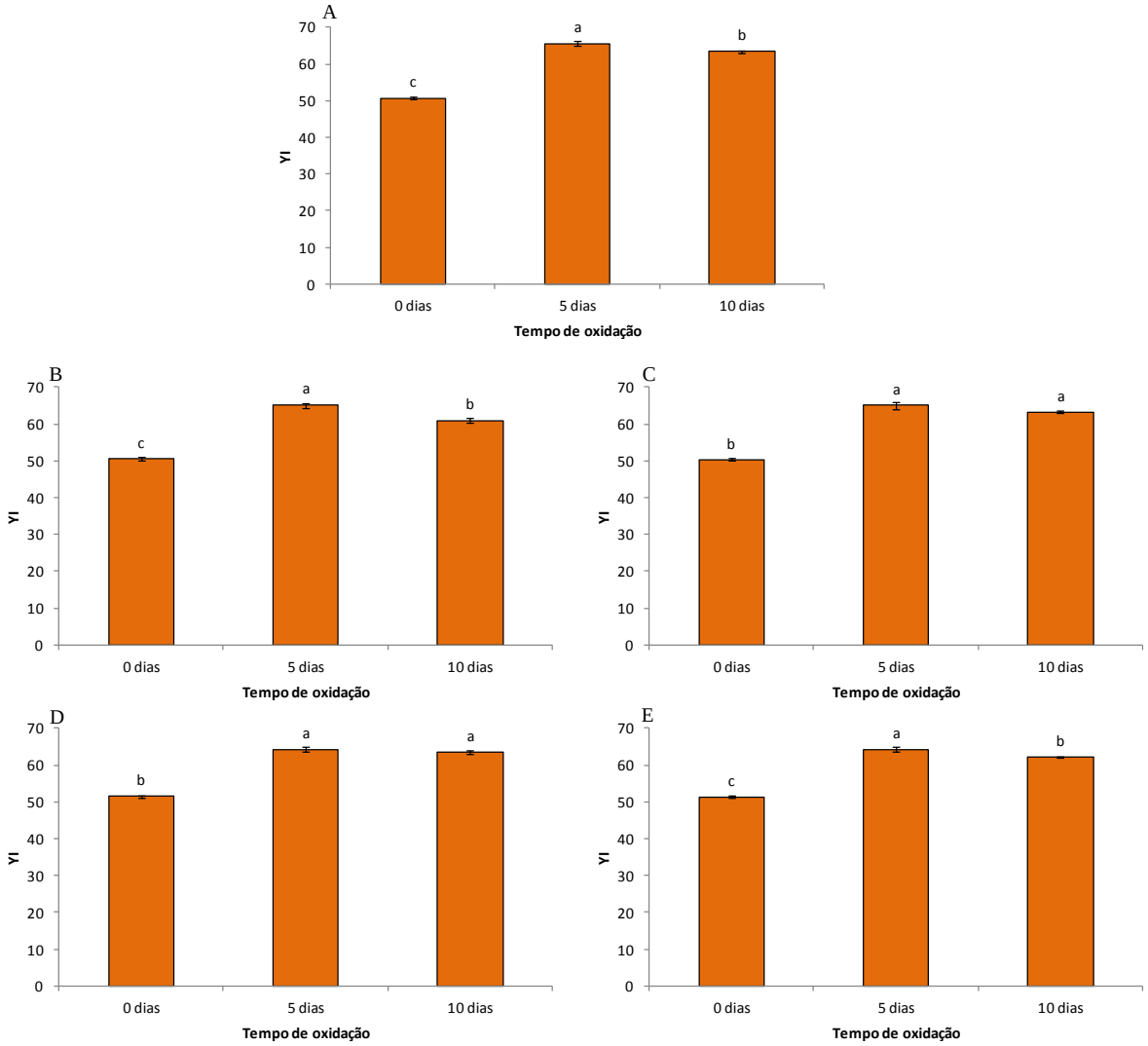


Figura 16 – Valores médios de Índice de amarelecimento (YI) das amostras de manteiga com adição de extrato a diferentes concentrações: 0 mg/g (A); 0,1 mg/g (B), 0,25 mg/g (C), 0,5 mg/g (D) e 1 mg/g (E). Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$), para dias diferentes de avaliação da oxidação (média±dp, n=15).

Por outro lado, a variação do tempo de oxidação resultou no aparecimento de três padrões: primeiro, a manutenção de valores semelhantes, sem alterações significativas de ΔE, como as registadas para a concentração de 0,25 mg/g, que apresentou valores de 1,22 (0 dias), 1,63 (5 dias) e 1,4 (10 dias); segundo, um aumento significativo do ΔE entre os dias 0 e 5, seguido de um decréscimo ao 10º dia, como se registou para a

concentração de 0,5 mg/g, tendo sido registados, neste caso, os valores de 1,13 (0 dias), 2,23 (5 dias) e 1,85 (10 dias); terceiro, um aumento constante e significativo com o aumentar da oxidação, acontecendo com as amostras contendo 0,1 mg/g e 1 mg/g de extrato, sendo os valores para a concentração de 0,1 mg/g de 1,35 (0 dias), 1,77 (5 dias) e 2,37 (10 dias) e para a concentração de 1mg/g de extrato de 1,47 (0 dias), 2,35 (5dias) e 3,20 (10 dias).

Relativamente ao YI os valores mais baixos foram obtidos no início do ensaio, não tendo sido observado diferenças significativas entre os resultados com as várias concentrações de extrato adicionadas. As amostras contendo 0,25mg/g de extrato apresentam valores mais baixos de YI (50,28), enquanto as amostras com 0,5mg/g de extrato apresentam valores mais elevados (YI=51,51). Não foi encontrada nenhum paralelismo entre o comportamento registado na avaliação do YI com os resultados de ΔE. Aos 5 dias de ensaio, verificou-se, mais uma vez, não existir influência da adição de extrato às amostras. Em todas elas se obtiveram valores semelhantes de YI, entre 64,27 (nas concentrações de 0,5 e 1 mg/g) e 65,11 (na concentração de 0,1mg/g), não existindo diferenças significativas entre os resultados. Apesar disso, é visível um comportamento decrescente constante do YI, com o aumentar da concentração de extrato. Comparando com os resultados de ΔE, verifica-se que, para as amostras com 1mg/g de extrato se obtiveram, no YI, os valores mais baixos, e para o ΔE, os valores mais elevados. Os resultados obtidos aos 10 dias de ensaio mostram, por um lado, um decréscimo do valor de YI, comparativamente ao valor de YI aos 5 dias de ensaio, e por outro lado, variações significativas entre as diferentes concentrações de extrato adicionadas. Apesar disso, não foi visível uma clara relação entre o aumento da concentração e o comportamento do YI. Assim, o valor mais baixo de YI foi obtido nas amostras com concentração de 0,1 mg/g (YI=60,97), sendo significativamente diferente dos valores mais altos, registados nas amostras com 0,5mg/g (YI=63,54) e controlo (YI=63,44). Estes dois valores foram também mais elevados e significativamente diferentes dos observados na concentração de 1mg/g (YI=62,09). De referir que o comportamento das amostras na avaliação do YI diferiu do observado na avaliação de ΔE.

Se a adição de concentrações crescentes de extrato não resultou num comportamento uniforme, o aumento do tempo de oxidação proporcionou a observação de dois tipos de efeitos: primeiro, a observação de resultados semelhantes entre os 10 e

5 dias de ensaio, sendo ambos significativamente diferentes dos valores no início do ensaio (amostras com 0,25 e 0,5 mg/g); segundo, a observação de valores de YI mais baixos no início do ensaio, atingindo o máximo aos 5 dias de ensaio.

A adição de concentrações crescentes de extrato não exerceu uma influência considerável. Relativamente ao ΔE, seria de esperar um aumento destes valores, no início do ensaio, proporcional à concentração adicionada. O que se verificou foi, que no início do ensaio, a adição de extrato não resultou em variações significativas de cor, sendo estas detetadas aos 5 e 10 dias de ensaio. Se se tomar este parâmetro como medida de oxidação, uma vez que as amostras ficaram com uma tonalidade mais escura com o avançar do tempo, o que se verifica é que a adição de 0,25 mg/g será a concentração mais indicada para uma proteção antioxidante efetiva, quer a curto (5 dias), quer a longo prazo (10 dias). Por outro lado, concentrações mais baixas e mais altas não apresentaram a mesma capacidade de proteger as amostras da oxidação. Uma vez que a variação de cor registada no início do ensaio, com adição crescente de extrato, não foi significativa, pode-se excluir este fator como o causador do aumento de ΔE, nos dias 5 e 10 de ensaio. No entanto, e do mesmo modo que na margarina, a análise do efeito do parâmetro concentração mostrou existir uma influência significativa sobre o ΔE, ($F_{3, 180}$ 9,095, ρ <0,001), sendo, no entanto, mais marcada a influência do fator tempo ($F_{2, 180}$ 18,830, ρ <0,001). Relativamente aos valores de YI, e considerando os valores deste parâmetro obtidos no dia 0 como referência, verifica-se novamente que não existiu um comportamento linear resultante da adição de extrato. Considerando o índice de amarelecimento como medida da oxidação das amostras, verifica-se que, em períodos mais curtos (5dias), a adição de extrato parece não proteger as amostras e, para períodos mais longos (10 dias), uma maior proteção contra a oxidação foi oferecida pela adição de 0,1mg/g de extrato de folhas de oliveira. Este parâmetro foi mais afetado pelo tempo de oxidação ($F_{2, 225}$ 739,994, ρ <0,001), não sendo de todo afetado pela variação de concentração ($F_{4, 225}$ 1,539, ρ =0,206).

Os resultados referentes à avaliação da variação de cor (ΔE) e de índice de amarelecimento (YI) da margarina são apresentados na Figura 17 e 18.

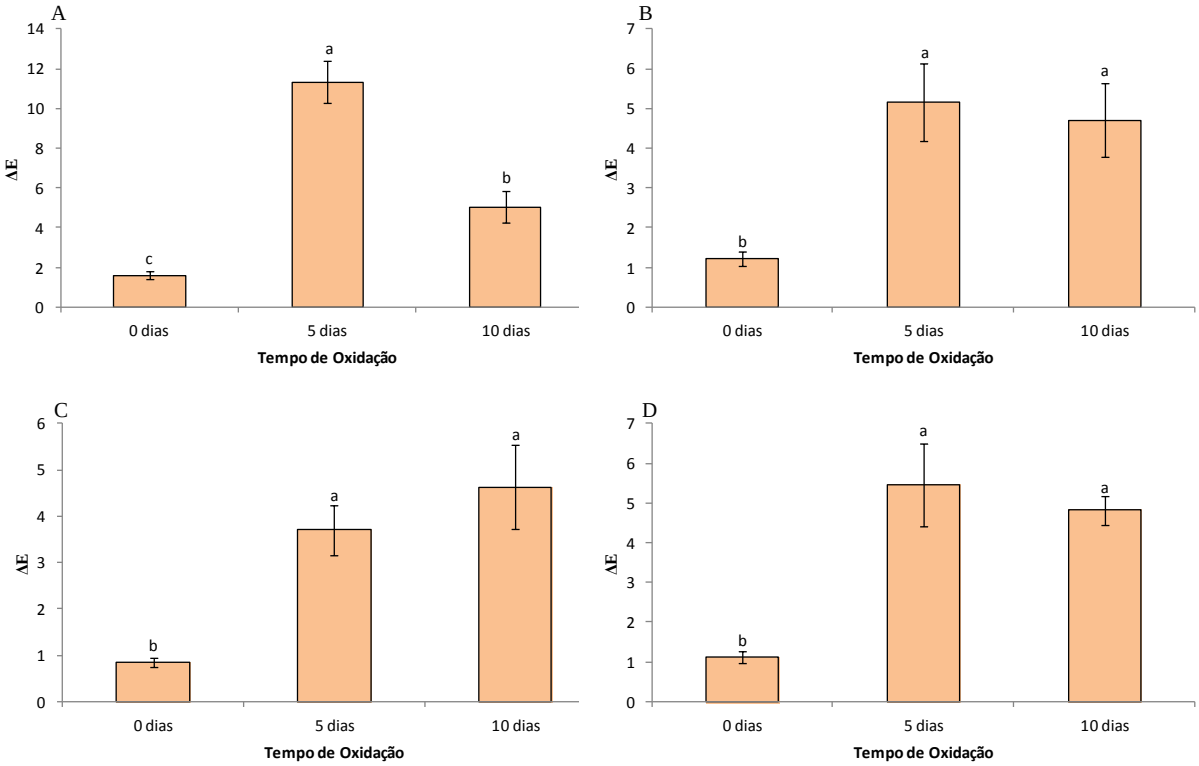


Figura 17 – Valores médios da variação de cor (ΔE) das amostras de margarina com adição de extrato a diferentes concentrações: 0,1 mg/g (A), 0,25 mg/g (B), 0,5 mg/g (C) e 1 mg/g (D), relativamente ao ensaio controlo (sem adição de extrato). Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$), para dias diferentes de avaliação da oxidação (média±dp, n=15).

Para a margarina, em todas as observações da variação de cor (ΔE), realizadas no início, aos 5 e 10 dias de ensaio, verificou-se uma variação positiva deste parâmetro. Isto indica um escurecimento da amostra, com a adição do extrato, sendo esta variação mais visível aos 5 dias de ensaio, comparativamente ao início e final do ensaio. No início do ensaio (0 dias) foram obtidos os valores de ΔE mais baixos, passando de 0,84, nas amostras com 0,5mg/g de extrato, para 1,12 e 1,22, nas amostras com 1 mg/g e 0,25 mg/g, respetivamente, até 1,6, nas amostras contendo 0,1mg/g de extrato. Aos 5 dias de ensaio, os valores de ΔE situaram-se entre 3,7, nas amostras contendo 0,5mg/g, atingindo o máximo de 11,33 nas amostras de menor concentração (0,1 mg/g). As concentrações de 0,25mg/g (ΔE=5,16) e 1mg/g (ΔE=5.45) apresentaram valores semelhantes entre si. Relativamente aos dados aos 10 dias de ensaio, o valor mais elevado de ΔE foi registado, mais uma vez, nas amostras com 0,1mg/g (5,03), apresentando as outras amostras valores próximos entre si, entre 4,63, na concentração de 0,5mg/g, 4,71 nas amostras com 0,25mg/g e, finalmente 4,82, nas amostras contendo 1mg/g de extrato. Tanto no início como no final do ensaio, os resultados indicam que o

aumento da concentração de extrato adicionado tem pouca influência neste parâmetro, no entanto, aos 5 dias de ensaio verifica-se influência da concentração no valor de ΔE.

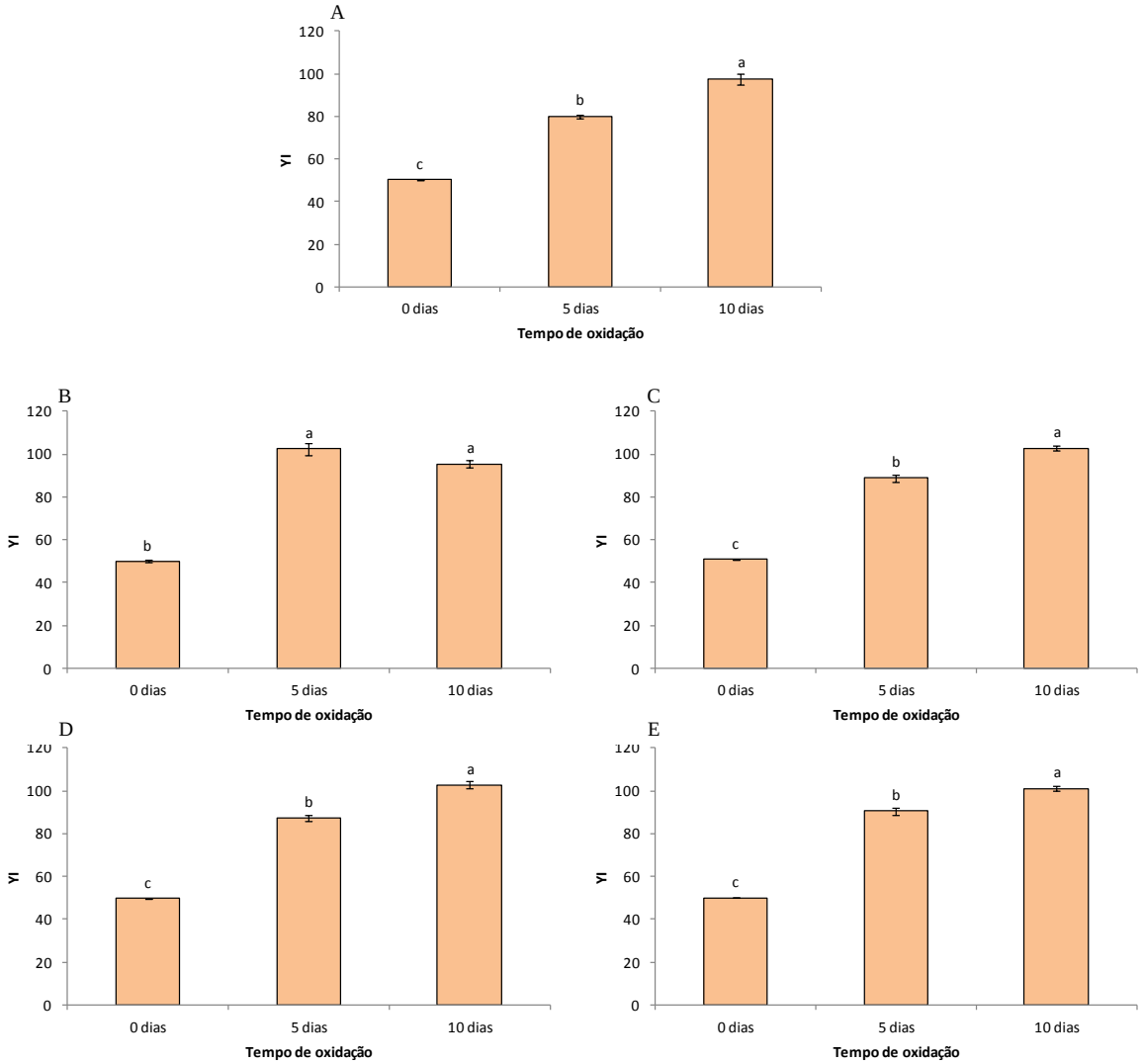


Figura 18 – Valores médios de Índice de amarelecimento (YI) das amostras de margarina com adição de extrato a diferentes concentrações: 0 mg/g (A); 0,1 mg/g (B), 0,25 mg/g (C), 0,5 mg/g (D) e 1 mg/g (E). Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$), para dias diferentes de avaliação da oxidação (média±dp, n=15).

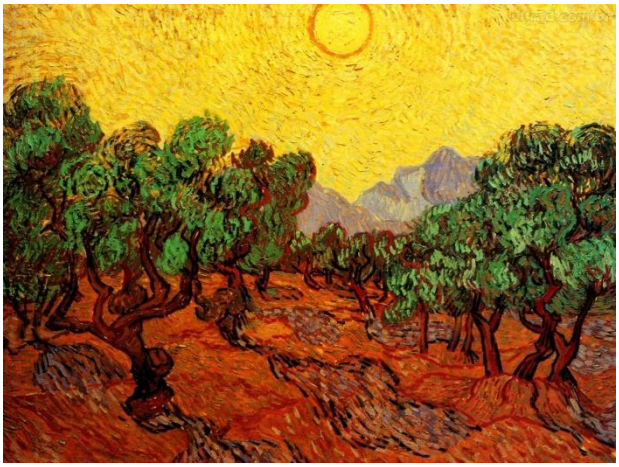
Se no início e final do ensaio, os resultados indicam que o aumento da concentração de extrato adicionado parece ter pouca influência neste parâmetro, aos 5 dias de ensaio, parece existir influência da concentração no valor de ΔE. Assim, aos 0 dias, apenas se detetaram diferenças significativas entre o valor de ΔE registado nas amostras com adição de 0,1mg/g e nas que continham 0,5mg/g de extrato. Em todas as outras situações, os valores não apresentaram diferenças significativas entre eles, indicando não existir influência da adição de extrato. Deve-se também realçar o fato de o valor de ΔE registado aos 0 dias, com a adição de 0,5 mg/g de extrato, ter sido o mais

baixo, indicando que foi nesta situação em que a cor da amostra ficou mais semelhante ao ensaio controlo. Os dados relativos aos 5 dias de ensaio, mostram por outro lado, que adição de extrato em concentrações de 0,25mg/g e acima, reduzem significativamente o escurecimento da amostra, relativamente à adição de apenas 0,1mg/g de extrato de folha. Os valores obtidos aos 10 dias de ensaio foram todos semelhantes, sem diferenças significativas entre eles.

Se a variação da concentração de extrato exerceu pouca influência no valor de ΔE, o tempo de oxidação mostrou ser um fator mais decisivo na variação de cor das amostras. Assim sendo, foram detetadas variações significativas no valor de ΔE, para a mesma concentração adicionada de extrato (0,1mg/g), entre o início (dia 0) e o 5ºdia de ensaio, e entre este e o final do ensaio (10 dias). No ensaio dos 5 dias, os valores de ΔE foram cerca de 4 vezes superiores comparando com os valores do dia 0, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1mg/g de extrato, atingindo um valor máximo de 11,33 na concentração de 0,1mg/g de extrato, valor este 7 vezes superior ao detetado no início do ensaio (1,6). Nas restantes concentrações, foram detetadas diferenças significativas entre os valores do início do ensaio e os valores de 5 e 10 dias de oxidação, que foram semelhantes entre si.

Tanto no ensaio da variação de cor (ΔE) como no ensaio do índice de amarelecimento (YI), a adição de extrato às amostras parece exercer pouca influência. Se no início do ensaio, fosse expectável uma subida destes valores com a adição de concentrações crescentes de extrato, devido à coloração acastanhada deste, o que se verificou foram valores semelhantes de variação de cor, indicando que a adição de extrato não tem influência nos parâmetros ΔE e YI, antes de ocorrer oxidação das amostras. Mesmo quando detetadas diferenças significativas, não é visível uma relação direta entre o aumento da concentração de extrato e o ΔE. No entanto, na análise do efeito dos parâmetros testados (concentração de extrato e tempo de oxidação), e considerando apenas o fator concentração, foi detetada a influência desta no ΔE ($F_{3, 180}$ 9,750, ρ <0,001). Se no início do ensaio esta variação de cor é baixa, quando avaliada aos 5 dias de ensaio, os valores aumentam, e na concentração mais baixa (0,1mg/g) atingem o máximo detetado em todo o ensaio, sendo que, aos 10 dias, os valores de ΔE são semelhantes entre as amostras. Isto poderá indicar que, para períodos mais longos, a adição de concentrações mais elevadas de extrato não significa proteção adicional contra a oxidação, mas que, para períodos mais curtos será mais eficiente a proteção antioxidante com concentrações acima de 0,1mg/g, nomeadamente para a concentração

de 0,5mg/g de extrato de folha de oliveira. Esta influência marcada, resultante do tempo de oxidação, é corroborada pela análise do efeito deste parâmetro ($F_{2, 180}$ 56,692, ρ <0,001). Esta tendência parece inverter-se se se reportar apenas aos valores de YI. Se consideramos os valores obtidos no dia 0 como referência, volta-se a verificar que não existe um comportamento linear resultante da adição de extrato. Mais uma vez, as variações significativas foram detetadas nas amostras contendo 0,1mg/g de extrato. Se aos 5 dias de ensaio, nestas amostras o YI é o mais elevado, aos 10 dias foi nestas amostras que se detetou o valor mais baixo. Se estes dados, por um lado, indicam que para períodos mais curtos, a adição de extrato a uma concentração de 0,5mg/g será mais indicada, para um período mais longo, a concentração de 0,1mg/g mostrou ser mais eficiente, de forma a reduzir alterações deste parâmetro. Como esperado, o tempo de oxidação ($F_{2, 225}$ 1371,534, ρ<0,001) exerceu um forte efeito no YI, não sendo detetado efeito significativo da variação de concentração ($F_{4, 225}$ 1,892, ρ =0,133).



5.CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu um avaliação da atividade antioxidante das folhas da oliveira, bem como o seu efeito protetor na oxidação em margarina e manteiga.

Relativamente ao primeiro objectivo deste trabalho, a avaliação da composição fenólica e da atividade antioxidante de quatro cultivares de oliveira (Arbequina, Cobrançosa, Galega vulgar e Picual), os resultados mostraram que a cultivar Arbequina, a mais utilizada em sistemas superintensivos de produção de azeitona, possui o teor mais elevado de fenóis totais (166,45 ± 4,00 mg/g) de entre as cultivares analisadas, ao mesmo tempo que regista uma maior atividade antioxidante no ensaio do poder redutor, sendo também as folhas da cultivar das quais se obteve um maior rendimento de extração. Baseado nestes dados, as folhas desta cultivar foram as selecionadas para a adição dos seus extratos a amostras de manteiga e margarina.

O perfil fitoquímico da cultivar Arbequina determinado por RMN ^{1}H caraterizou-se pela presença de glucose, sacarose, oleuropeína, luteolina-4'-*O*-glucósido, luteolina, hidroxitirosol acetato, hidroxitirosol e luteolina-7-*O*-glucósido.

Em relação ao segundo objetivo do trabalho, a avaliação do efeito protetor de extratos de folha de oliveira, na oxidação de manteiga e margarina, a adição de extrato de folha de oliveira não causou variações significativas no teor de fenóis totais quantificados na manteiga, sendo que, no caso da margarina, a adição de extrato de folha a uma concentração de 1 mg/g resultou num aumento significativo do teor em fenóis totais detetados, verificando-se um decréscimo com a adição de extrato nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5 mg de extrato/g relativamente ao controlo. A avaliação da atividade antioxidante da manteiga e margarina, usando o método do DPPH, mostrou uma forte capacidade bloqueadora na margarina, por oposição ao verificado na manteiga. No entanto, em ambas as matrizes, verificou-se que a adição de extrato aumentou a capacidade antioxidante da manteiga e margarina, usando esta metodologia. De maneira semelhante ao observado no método do DPPH, usando a metodologia ABTS para avaliação da capacidade antioxidante, as amostras de margarina apresentaram valores mais elevados, comparativamente às amostras de manteiga. No entanto, a adição de extratos resultou em comportamentos diferenciados para cada uma das amostras. No caso da manteiga, a adição de concentrações mais baixas aumentou a capacidade antioxidante, ao inverso do registado na concentração mais elevada (1mg/g). Por outro lado, no caso da margarina, nas concentrações mais baixas de extrato, são

mais baixos ou semelhantes ao controlo, sendo que a adição de extrato na concentração mais elevada aumentou significativamente a capacidade antioxidante das amostras de margarina.

No que respeita à determinação da cor na margarina, no início do ensaio e para parâmetro L^* e L, verificou-se um decréscimo dos valores com o tempo de oxidação. A adição de extrato altera este parâmetro, no início do ensaio, apenas para algumas concentrações, nomeadamente a mais baixa (0,1mg/g) e a mais elevada (1mg/g). Se aos cinco dias de ensaio, para a manutenção deste parâmetro em valores semelhantes aos iniciais seriam adequadas as concentrações mais elevadas de extrato, para os 10 dias de ensaio, os valores indicam que a concentração mais baixa de extrato seria mais adequada. No parâmetro a^* e a, e para o início do ensaio, a adição de extrato não causou variações significativas em relação ao controlo. A adição de qualquer concentração de extrato, avaliada aos 5 dias, permitiu manter os valores deste parâmetro semelhantes aos iniciais, enquanto que a concentração mais baixa manteve estes valores, quando avaliados aos 10 dias. Para o parâmetro b^* e b, a adição de extrato, no início do ensaio, apenas causou variações significativas quando se usou a concentração de 0,5mg/g. Aos cinco dias de ensaio, os valores de b^* e b aumentaram, sendo este aumento semelhante em todas as amostras. No final do ensaio, os valores de b^* e b são semelhantes entre todas as amostras, tendo sido a variação existente em relação aos 5 dias de ensaio maior nas amostras sem extrato.

Na manteiga, os resultados relativos à luminosidade mostraram um comportamento semelhante aos obtidos com a margarina, isto é, um decréscimo com o tempo de oxidação. A adição de extrato no início do ensaio apenas resultou em diferenças significativas para a concentração de 1mg/g. Quer aos cinco dias, quer aos dez dias, os valores deste parâmetro relativamente aos valores iniciais não foram afetado pela adição de extrato às amostras. O parâmetro a^* e a, diminui como tempo de oxidação, verificando-se no início do ensaio variações significativas em relação ao controlo em todas as concentrações de extrato adicionadas, mantendo-se este comportamento ao longo do tempo de oxidação. Relativamente ao parâmetro b^* e b, não foi verificado qualquer efeito da adição dos extratos de folhas à manteiga, quer na primeira leitura, no início do ensaio, quer após a passagem do 5º dia de oxidação, já que os valores não apresentaram diferenças significativas. Os valores registados ao 10º dia

de ensaio mostram que a adição de extratos levou a uma redução desta coordenada, relativamente às amostras controlo.

Os valores de ΔE, para a margarina, aumentaram ao longo do tempo de oxidação, mostrando também que as concentrações mais elevadas de extrato permitem que este parametro apresente valores mais baixos. No caso da manteiga, e apesar dos valores tambem aumentarem ao longo do tempo, a concentração de 0,25mg/g permitiu manter estes valores numa escala mais baixa.

Os valores de YI, para a margarina, aumentam com o tempo de oxidação, sendo que a concentração mais baixa de extrato apresenta uma maior proteção a longo prazo, enquanto que para menor tempo de oxidação, concentrações mais elevadas apresentaram resultados mais promissores. Em relação à manteiga, verificou-se um comportamento semelhante ao registado na margarina, com a adição de extrato.

A realização deste trabalho permitiu uma primeira avaliação do uso de extratos de folhas de oliveira como agente de proteção contra a oxidação de margarina e manteiga. Os resultados obtidos mostram que existe algum potencial do uso das folhas de oliveira, sendo necessário a continuação de estudos neste sentido. Para isso, é fundamental o uso de outros métodos de avaliação da oxidação e da ação protetora dos extratos, nomeadamente a determinação do Índice de peróxidos, período de indução determinado por Rancimat, determinação de Substâncias Reativas com o Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBARS), entre outras metodologias. O uso de extratos de diferentes cultivares, como as utilizadas na parte inicial do presente trabalho (Cobrançosa, Galega vulgar e Picual), metodologias de extração e de incorporação na matriz poderão também ser alvo de estudos subsequentes.

6.BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Abaza, L., Youssef, N., Manai, H., Haddada, F. Methenni, K., Zarrouk, M., 2011. Chétoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceites*, **62**, 96–104.

Abdel-Hameed, E., 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chemistry*, **114**, 1271-1277.

Ahmad-Qasem, M., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Mulet, A., García-Pérez, J., 2013a. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*, **50**, 189–196.

Ahmad-Qasem, M., Cánovas, J., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J., García-Pérez, J., 2013b. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **17**, 120–129.

Alasalvar, C., Karamac, M., Amarowicz, R., Shahidi, F., 2006. Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut green leafy cover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4826-4832.

Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., Ulku, S., 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (Olea europaea L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, **62**, 342–348.

Arantes, R., 2008. Avaliação da ação do pó da folha de oliveira (D-lenolato) em indicadores fisiológicos do murganho. Dissertação de mestrado em Biologia Clinica Laboratorial. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; pp 1-74.

Aruoma, O., 1996. Assessment of Potential Prooxidant and Antioxidant Actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, 1617–1625.

Aruoma, O., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 199–212.

Bao, J., Zhang, D., Zhang, J., Huang, P., Huang, P., Huang, S., 2007. Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41. *FEBS Letters*, **581**, 2737−2742.

Barranco, D., Fernández-Escóbar, R., Rallo, L. 1999. El cultivo del olivo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 3ª Edição, 122-127.

Barrera-Arellano, D.,1993. Estabilidade em óleos e gorduras. *Óleos e Grãos*, **6**, 10–13.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, **68**, 457–462.

Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods—An overview of the last decade. *Molecules*, **12**, 1679–1719.

Berger, K. G., Hamilton, R. J, 1995. In: Developments in Oils and Fats;Hamilton, R. J., (ed.); Chapman & Hall: London, cap. 7

Berker, K., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R., 2007. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP) and ferricyanide reagents. *Talanta*, **72**,1157-1165.

Berset, C.; Cuvelier, M. E., 1996. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des aliments*, **16**, 219–245.

Bhale, S., Xu, Z., Prinyawiwatkul, W., King, J., Godber, J., 2007. Oregano and Rosemary Extracts Inhibit Oxidation of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Menhaden Oil. *Journal of Food Science*, **72**, 504–508.

Bian, S., Jiang, Y., 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, **120**, 264–270.

Bilgin, M., Sahin, S., 2013. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **44**, 8–12.

Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S., 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidants from chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, **108**, 253-262.

Bouaziz, M., Sayadi, S. 2005. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 497–504.

Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., Kechaou, N., 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, **29**, 412-419.

Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., Hammami, M., 2013. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, **49**, 256–264.

Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., Nucci, R., 2002. *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4934–4940.

Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M. 2000. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, **71**, 553-562.

Caturla, N., Pérez-Fons, L., Estepa, A., Micol, V., 2005. Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwiterionic phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **137**, 2–17.

Charoenprasert, S., Mitchell, A., 2012. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 7081–7095.

Chiou, A., Kalogeropoulos, N., Salta, F., Efstathiou, P., Andrikopoulos, N., 2009. Pan-frying of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf

extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 1090–1097.

de Bock, M., Derraik, J., Brennan, C., Biggs, J., Morgan, P., Hodgkinson, S., Hofman, P., Cutfield, W., 2013. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One* 2013, **8**, e57622.

de Bock, M., Derraik, J., Cutfield, W., 2012. Polyphenols and glucose homeostasis in humans. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, **112**, 808–815.

Dias, T.R., Alves, M.G., Tomás, G.D., Socorro, S., Silva, B.M., Oliveira, P.F., 2014. White tea as a promising antioxidant medium additive for sperm storage at room temperature: a comparative study with green tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 608–617.

Dowling, D., Simmons, L., 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. Proceedings of the Royal Society B: Biological Science, 276, 1737–1745.

El, S., Karakaya, S., 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, **67**, 632–638.

Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E., 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 32–35.

Farag, R., El-Baroty, G., Basuny, A., 2003. 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 and Technology*, **38**, 81–87.

Farag, R., Mahmoud, E., Basuny, A., 2007. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science and Technology*, **42**, 107–115.

Farmer, E., Bloomfield G., Sundaralingam A., Sutton D., 1942. The course and mechanism of autoxidation reaction in olefinic and polyfinic substances, including rubber. *Transations of the Faraday Society*, **38**, 348–356.

Ferreira, M., Andrade, P., Oliveira, M., Ferreira, I., Leitão, R., Seabra, R., 1997. Os compostos fenólicos como possíveis marcadores da autenticidade de produtos de origem vegetal. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, **1**, 56−63.

Ferreira, N., 2007. Incorporação de folha de oliveira (Olea europaea L.) na dieta de suínos em crescimento. Relatório Final de Estágio. Licenciatura em Engenharia Zootécnica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pp:31-32.

Ferreira, I., Barros, L., Soares, M., Bastos, M., Pereira, J., 2007. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, **103**, 188-195.

Floch, F., Tena, M., Ríos, A., Valcárcel, M., 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, **46**, 1123–1130.

Francis, F. J.; Clydesdale, F. H. Food Colorimetry: Theory and Applications; AVI Publishing: Westport, CT, 1975.

Frankel, E., Huang, S.-W., Kanner, J., German, J., 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 1054–1059.

Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menéndez, J., Menéndez-Gutiérrez, M., Micol, V., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**, 643–654.

Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, M., Gilani, A., Saari, N., 2012. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 3291–3340.

Giannakopoulou, E., Mitsopoulos, G., Hagidimitriou, M., Papageorgiou, V., Komaitis, M. 2010. Influence of Cultivar, Harvesting Season and Geographical Origin on Phenolic Content in Leaves of Greek Olive Cultivars. *Acta Horticulturae*, **924**, 437–443.

Guinda, A., 2006. Use of solid residue from the olive industry. *Grasas y Aceites*, **57**, 107–115.

Guinda, Á., Pérez-Camino, M. C., Lanzón, A., 2004. Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (olea europaea). *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 22–26.

Gülcin, I., 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, **32**, 431–438.

Halliwell, B., 1996. Antioxidants in human health and disease, *Annual Review of Nutrition*, **16**, 33–50.

Halliwell, B., Murcia, M., Chirico, S., Aruoma, O., 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **35**, 7–20.

Haloui, E., Marzouk, Z., Marzouk, B., Bouftira, I., Bouraoui, A., Fenina, N., 2010. Pharmacological activities and chemical composition of the *Olea europaea* L. leaf essential oils from Tunisia. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **8**, 204-208.

Hamilton, R. J., Rossell, J. B., Hudson, B. J. F., Löliger, J., 1983. In: Rancidity in Foods, Allen J. C., Hamilton R. J., (Ed).; Applied Science Publishers LTD.; London, p . 1.

Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 1090-2097.

Hayes, J., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M., Kerry, J., 2011. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, **126**, 948–955.

Herrero, M., Temirzoda, T., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibañez, E., 2011. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 7511-7520.

Hunter, R. S. The Measurement of Appearance; Hunter Associates Laboratory: Fairfax, VA, 1973.

INE, 2011. Estatísticas Agrícolas 2010. Instituto Nacional de Estatística, I.P. Lisboa. 118 pp.

INE, 2014. Balança Alimentar Portuguesa. 2008/2012. 2 de Abril de 2014.

Jadhav, S. J.; Nimbalkar, S. S.; Kulkarni, A. D.; Madhavi,D. L.; Rajalakshmi, D.; Narasimhan, S., 1996. In: Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives; Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., (Ed.). Marcel Dekker Inc.; New York; p. 5.

Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J., Luque de Castro, M., 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography*, **1108**, 76−82.

Jorge, N., Gonçalves, L., 1998. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. *Boletim SBCTA*, **32**,40–47.

Komaki E, Yamaguchi S, Maru I, Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., Tsukada, Y., 2003. Identification of anti-α-amylase components from olive leaf extracts. *Food Science and Technology Research*, **9**, 35–39.

Kontogianni, V., Gerothanassis, I., 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Natural Product Research*, **26**, 186–189.

Kubow, S., 1993. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutrition Reviews*, **51**, 33–40.

Lafka, T., Lazou, A., Sinanoglou, V., Lazos, E., 2013. Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods*, **2**, 18-31.

Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**, 244–282.

Lee, O., Lee, B., Lee, J., Lee, H., Son, J., Park, C., 2009. Assessment of phenolic-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, **100**, 6107–6113.

Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P., Chang, Y., Huang P., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 1029–1037.

Lopes, C., Barcelos, M., Dias, N., Carneiro, J., Abreu, W., 2014. Effect of the addition of spices on reducing the sodium content and increasing the antioxidant activity of margarine. *LWT - Food Science and Technology*, **58**, 63-70.

MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L, 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, 2046–2056.

Makris, D., Boskou, G., Andrikopoulos, N., 2007. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**, 125–132.

Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A., Pereira, J., 2013b. Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality. *Food and Bioprocess Technology*, **6**, 509–521.

Malheiro, R., Rodrigues, N., Manzke, G., Bento, A., Pereira, J., Casal, S., 2013a. The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Industrial Crops and Products*, **44**, 37–43.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2006. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal for Clinical Nutrition*, **79**, 727–47.

Maranz, S., Wiesman, Z., Garti, N., 2003. Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6268-6273.

Mehta, B., 2006. Ragi (*Eleusine coracana* L.) – a natural antioxidant for ghee (butter oil). *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 86–89.

Meirinhos, J., Silva, B., Valentão, P., Seabra, R., Pereira, J., Dias, A., Andrade, P., Ferreres, F., 2005. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Oleae europaea* L.) leaf cultivars. *Natural Product Research*, **19**, 189-195.

Micol, V., Caturla, N., Pérez–Fons, L., Más, V., Pérez, L., Estepa, A., 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*, **66**, 129–136.

Monteiro, A. M. (1999). A oliveira. Série Património Natural Transmontano. João Azevedo, Editor. Mirandela.

Moreira, A.B., Mancini-Filho, J., 2004. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, **17**, 411–424.

Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D., Kefalas, P., 2008. Optimisation of the extraction of olive *Olea europaea* leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**, 977-985.

Orak, H., Isbilir, S., Yagar, H., 2012. Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. *Food Science and Biotechnology*, **21**, 1065-1074.

Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. Adenan, I., 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of Cocoa beans. *Food Chemistry*, **100**, 1523–1530.

Paiva-Martins, F., Correia, R., Felix, S., Ferreira, P., Gordon, M., 2007. Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 4139–4143.

Pawar, N., Gandhi, K., Purohit, A., Arora, S., Singh, R., 2012. Effect of added herb extracts on oxidative stability of ghee (butter oil) during accelerated oxidation condition. *Journal of Food Science and Technology*, 1-7.

Peralbo-Molina, A., Castro, M., 2013. Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. *Trends in Food Science & Technology*, **32**, 16−24.

Pereira, A., Ferreira, I., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J., 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, **12**, 1153–1162.

Prasad, K., Yang, B., Yang, S., Chen, Y., Zhao, M., Ashraf, M., Jiang, W., 2009. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. *Food Chemistry*, **116**, 1–7.

Proença-Da-Cunha, A., Silva, A., Roque, O., 2003. Plantas E Produtos Vegetais Em Fitoterapia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Puravankara, D., Boghra, V., Sharma, R., 2000. Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 522-526.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, **26**, 1231-1237.

Reynertson, K., Yang, H., Jiang, B., Basile, M., Kennelly, E., 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, **109**, 883–890.

Rice-Evans, C. A., Miller, J. N., Paganga, G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 933–956.

Rodrigues, A.S., Batoréu, M.C., Goulart, M., 2005. Trabalhadores expostos a produtos de lipoperoxidação e antioxidantes tiol em crómio. *Mutagenesis*, **20**, 311–315.

Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, **99**, 5261–5269.

Ryan D., Robards K., Lavee, S., 1999, Phenolic compounds in olives. Critical review. *Analyst*, **123**, 31–44.

Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S., 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, **92**,147–176.

Salah, M., Abdelmelek, H., Abderraba, M., 2012. Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Medicinal Chemistry*, **2**, 107–111.

Salta, F., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N., 2007. Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*, **13**, 413–421.

Sasaki, Y., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwamaa, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **519**, 103–119.

Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., Saladin, R., 2007. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **362**, 793–798.

Savarese, M., Marco, E., Sacchi, R., 2007. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* Cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **105**, 761–770.

Scognamiglio, M., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Fiumano, V., De Luca, P. F., Monaco, P., Fiorentino, A., 2012. Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). *Food Research International*, **46**, 294–303.

Seifried, H., Anderson, D., Fisher, I., Milner, J., 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **18**, 567–579.

Sevim, D., Tuncay, O., Koseoglu, O., 2013. The effect of olive leaf addition on antioxidant content and antioxidant activity of ‘‘Memecik’’ olive oils at two maturity stages. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **90**, 1359–1369.

Siger, A., Czubinski, J., Kachlicki, P., Dwiecki, K., Lampart-Szczapa, E., Nogala-Kalucka, M., 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, **25**, 190–197.

Silva, F., Borges, M., Ferreira, M., 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, **22**, 94–103.

Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A., Vilas Boas, L., 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, **12**, 385–395.

Simopoulos, A., 2001. The Mediterranean Diets: What is so important about the diet of Greece? The scientific evidence. *Journal of Nutrition*, **131**, 3065S−3073S.

Sims, R. J., Fioriti, J. A., 1980. In: CRC Handbook of Food Additives, 2nd edition, vol. II; Furia T. E., (Ed).; CRC Press Inc.; p. 13.

Singh, I., Mok, M., Christensen, A., Turner, A., Hawley, J., 2006. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **18**, 127–132.

Singleton, V., Rossi, J., 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A., Simonic, M., Knez, Z., 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **89**, 191–198.

Soares, S., 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, **15**, 71–81.

Somova, L., Shode, F., Ramnanan, P., Nadar, A., 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies africana leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **84**, 299–305.

Soler-Rivas, C., Epsin, J.C., Wichers, H.J., 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1013–1023.

Soni, M., Burdock, G., Christian, M., Bitler, C., Crea, R., 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 903–915.

Sreeramulu, D., Raghunath, M., 2011. Antioxidant and phenolic content of nuts, oil seeds, milk and milk products commonly consumed in India. *Food and Nutrition Sciences*, **2**, 422-427.

St. Angelo, A., 1996. Lipid oxidation on foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition.* **36**, 175–224.

Tabera, J., Guinda, Á., Ruiz-Rodríguez, A., Señoráns, F. J., Ibáñez, E., Albi, T., Reglero, G., 2004. Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4774–4779.

Tapiero, H., Tew, K., Nguyen Ba, G., Mathé, G., 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **56**, 200−207.

Tavares, M., Correia, F., Maia, S., Gonçalves, M., Marques, C., Figueiredo, P., Mendes, B., 2011. Antioxidant activity of breast milk and commercial milks and formulas. X Congresso de Nutrição e Alimentação / II Congresso Ibero-Americano de Nutrição, Lisboa.

Valavanidis, A., Nisiotou, C., Papageorgiou, Y., Kremli, I., Satravelas, N., Zinieris, N., Zygalaki, H., 2004. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2358−2365.

Van Sumere, C., 1999. Phenols and phenolic acids. In Harbone, J. (Ed). Methods in Plant Biochemistry, vol 1. Academic Press, Londres, pp. 29−73.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M., 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1619–1624.

Xu, Z., 2012. Important Antioxidant Phytochemicals in Agricultural Food Products. In Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals, Xu , Z., Howard, L., (Eds). Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Zheng, W., Wang, S. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5165–5170