UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Dissertação:

Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (*Olea europea* L.)

Bruna Wendt Böhmer

Pelotas, 2018

Bruna Wendt Böhmer

Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (*Olea europea* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Rui Carlos Zambiazi

Co-orientadora: Andressa Carolina Jacques

Pelotas, 2018.

Bruna Wendt Böhmer

Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (*Olea europea* L.)

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

Data da Defesa: 22/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiazi (Orientador). Doutor em Alimentos e Ciência Nutricional pela University of Manitoba – Canadá.
Profª. Drª. Carla Rosane Barboza Mendonça. Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Drª. Deborah Otero. Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande.
Drª. Mariângela Bruscatto. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho a minha família

Agradecimentos

A Deus, em quem estão escondidos os mistérios da sabedoria e da ciência (Cl.2:3), pelo seu amor imensurável!

Ao meu esposo Vitor, por sempre se mostrar este companheiro dedicado e amoroso, como uma só carne!

A minha mãe, Vera, por toda a motivação em me fazer acreditar que era possível!

Aos meus irmãos, Leandro e Germano e sobrinhos Gustavo, Antonella e Valentinna pelo simples fato de existirem.

Aos meus avós Bruno (*in memorian*) e Wilma pelo cuidado e carinho.

A tia Edla, por ser como uma mãe, pelo incentivo e força transmitidos.

Aos sogros Izaida e Selmar, por me acolherem como filha.

Aos cunhados Abigail, Jônatas, Elisângela, Vicente, Manuella e Pâmela pela amizade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Cromatografia, Tailise Zimmer, Deborah Otero, Lisiane Vergara, Cristina Jansen, Fernanda Oliveira, Fernanda Kummreich, Bruna Antunes, Michele Crizel e Alexandre Lorini pelos momentos de dificuldades e alegrias que compartilhamos.

A Raquel Oliveira, por toda ajuda e dedicação para execução das análises, muito obrigada!

A minha amiga Francine Bueno, pelos ensinamentos transmitidos ainda no período de iniciação científica, os quais muito me auxiliaram para realização deste trabalho.

À empresa Batalha, produtora de azeite por ceder as amostras.

Ao meu orientador, Rui Carlos Zambiazi, pela orientação concedida.

À professora Andressa Jacques, pelo auxílio e disponibilidade.

Ao professor Eliézer Gandra, por gentilmente disponibilizar seu laboratório e materiais para realização das análises microbiológicas.

A todos colegas, amigos, professores e funcionários do DCTA que de alguma forma fizeram parte desta trajetória, contribuindo para meu crescimento.

Á UFPel e ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

O homem tem em si uma sede de infinito, uma saudade de eternidade, uma busca de beleza, um desejo de amor, uma necessidade de luz e de verdade, que o impelem rumo ao Absoluto; o homem tem em si o desejo de Deus.

(Joseph Ratzinger)

BÖHMER, Bruna Wendt. **Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (*Olea europea* L.).** 2018. 77p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Resumo

A extração do azeite de oliva gera grandes quantidades de resíduos, em média, apenas 21% do peso da azeitona correspondem a azeite, os 79% restantes consistem em água, casca, polpa e caroço, os quais constituem o bagaço. Cerca de 98% dos compostos fenólicos passam para o bagaço no processo de extração do azeite por duas fases. Com o intuito de obter alternativas para a utilização deste resíduo, e para o problema de fitotoxicidade causada pela alta concentração de compostos fenólicos, este estudo teve como objetivo otimizar a extração de compostos fenólicos do bagaço utilizando diferentes extratos metanólicos, e de avaliar potencial biológico destes extratos. A otimização da extração dos compostos fenólicos e a avaliação da atividade antioxidante (FRAP) foram realizadas por espectrofotometria, definindo as amostras a serem avaliadas pela aplicação da superfície de resposta, a qual constitui uma ferramenta estatística de planejamento experimental. Os dois extratos com maior concentração de compostos fenólicos foram selecionados para análise de atividade antitumoral e antimicrobiana *in vitro*. Através da metodologia de superfície de resposta foi possível observar que as duas condições que promoveram maior extração de compostos fenólicos foram obtidas no ensaio com 40% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos (ensaio 7), e com 80% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos (ensaio 8). A maior atividade antioxidante foi obtida no extrato com 40% metanol, 45 ºC e tempo de 180 minutos (ensaio 5). No teste de MTT, o extrato 7 apresentou atividade antitumoral frente à linhagem tumoral de glioma na concentração ≥ 100 $\mu g.mL^{-1}$ em 24 horas de incubação, ≥ 500 $\mu g.mL^{-1}$ em 48 horas e ≥ 200 $\mu g.mL^{-1}$ em 72 horas de incubação; o extrato 8 exibiu atividade antitumoral na concentração ≥ 300 $\mu g.mL^{-1}$ em 24 horas de incubação, ≥ de 200 $\mu g.mL^{-1}$em 48 horas e ≥ 300 $\mu g.mL^{-1}$ em 72 horas de incubação. No ensaio de Sulforodamina B, o extrato 7 exerceu atividade antitumoral frente á linhagem tumoral de glioma na concentração ≥ 200 $\mu g.mL^{-1}$ em 24 horas de incubação, ≥ 50 $\mu g.mL^{-1}$ em 48 horas e ≥ 100 $\mu g.mL^{-1}$ em 72 horas de incubação; o extrato 8 demonstrou atividade antitumoral na concentração ≥ 100 $\mu g.mL^{-1}$ nos três períodos de incubação. No teste de disco difusão os extratos selecionados apresentaram halos de inibição frente aos micro-organismos testados. No ensaio de concentração inibitória mínima os extratos selecionados exerceram atividade antimicrobiana moderada e fraca, respectivamente. Nos testes de concentração bactericida mínima os extratos não apresentaram atividade, demonstrando não ter ação bactericida, somente bacteriostática.

Palavras- Chave: planejamento experimental; resíduo; atividade antioxidante.

BÖHMER, Bruna Wendt. **Phenolic compounds from the pomace of olive oil extraction (Olea europea L.).** 2018. 77p. Dissertation (Masters in Food Science and Technology) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Abstract

Extraction of olive oil generates large amounts of waste. On average, only 21% of the weight of the olive corresponds to olive oil, the remaining 79% consists of water, bark, pulp and stone, which constitute bagasse. About 98% of the phenolic compounds pass into the bagasse in the process of extraction of the oil by two phases. In order to obtain alternatives for the use of this residue, and for the phytotoxicity problem caused by the high concentration of phenolic compounds, this study aimed to optimize the extraction of phenolic compounds from the bagasse using different methanolic extracts, and to evaluate the biological potential of these extracts. The optimization of the extraction of the phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant activity (FRAP) were performed by spectrophotometry, defining the samples to be evaluated by the application of the response surface, which is a statistical tool for experimental planning. The two extracts with the highest concentration of phenolic compounds were selected for analysis of antitumor and antimicrobial activity in vitro. It was possible to observe that the two conditions that promoted higher extraction of phenolic compounds were obtained in the 40% methanol, 70 °C and 180 minutes (test 7) and 80% methanol, 70 °C and time of 180 minutes (test 8). The highest antioxidant activity was obtained in the extract with 40% methanol, 45 °C and time of 180 minutes (test 5). In the MTT test, extract 7 showed antitumor activity against the glioma tumor line at ≥ 100 $\mu g.mL^{-1}$ in 24 h incubation, ≥ 500 $\mu g.mL^{-1}$ at 48 hours and ≥ 200 $\mu g.mL^{-1}$ at 72 hours of incubation; the extract 8 exhibited antitumor activity at the concentration ≥ 300 $\mu g.mL^{-1}$ in 24 hours incubation, ≥ 200 $\mu g.mL^{-1}$ at 48 hours and ≥ 300 $\mu g.mL^{-1}$ at 72 hours incubation. In the Sulforodamine B assay, extract 7 exerted antitumor activity against the glioma tumor line at ≥ 200 $\mu g.mL^{-1}$ concentration in 24 hours incubation, ≥ 50 $\mu g.mL^{-1}$ at 48 hours and ≥ 100 $\mu g.mL^{-1}$ in 72 hours of incubation; extract 8 demonstrated antitumor activity at the concentration ≥ 100 $\mu g.mL^{-1}$ in the three incubation periods. In the disc diffusion test, the selected extracts showed inhibition halos against the microorganisms tested. In the minimum inhibitory concentration assay the selected extracts exerted moderate and weak antimicrobial activity, respectively. In the minimum bactericidal concentration tests, the extracts showed no activity, showing no bactericidal action, only bacteriostatic.

Keywords: experimental planning; residue; antioxidant activity.

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg - Micrograma

AA - Atividade antioxidante

ATCC - (do inglês *American Type Culture Collection)*

BHI - (do inglês *Brain Heart Infusion*)

CBM - Concentração bactericida mínima

CFT - Conteúdo fenólico Total

CIM - Concentração inibitória mínima

CMF- Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio

DMEM - (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's medium)*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO – Densidade Óptica

EF – Extrato Fenólico

EFSA - (do inglês *European Food Safety Authority*)

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FBS - (do inglês *Fetal Bovine Serum*)

FRAP - (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

HT - Hidroxitirosol

MTT- Sal de tetrazólio

RSM- (do inglês *Response Surface Methodology*)

SRB - Sulforodamina B

TRIS - Solução tampão padrão

TSA - (do inglês *Tryptone soya ágar*)

UFC - (do inglês *Colony forming unit*)

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxograma da produção de azeite através dos diferentes tipos de extração..... 21
Figura 2 - Estrutura química da oleuropeína. 27
Figura 3 - Estrutura do hidroxitirosol. 28
Figura 4 - Estrutura do tirosol. 28
Figura 5 - Transformação química da oleuropeína..... 29
Figura 6 - Superfícies de resposta das variáveis T ºC x concentração % (a), tempo (min) x concentração % (b) e tempo (min) x T ºC (c). 44
Figura 7 - Superfícies de resposta das variáveis T ºC x concentração % (a), tempo (min) x concentração % (b) e T ºC x tempo (min) (c). 49
Figura 8 - Gráficos de viabilidade das células de linhagem de glioma de rato C6 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de bagaço de azeite. 51
Figura 9 - Gráficos de viabilidade das células de linhagem de glioma de rato C6 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de bagaço de azeite. 53
Figura 10 - Gráficos de viabilidade das células de linhagem de astrócitos expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de bagaço de azeite. 56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Níveis e variáveis independentes analisadas. 33
Tabela 2 - Variáveis dependentes e independentes do experimento 2. 34
Tabela 3 - Valores reais e codificados para a resposta concentração de compostos fenólicos. 40
Tabela 4 - Efeitos das variáveis frente a resposta CTF. 41
Tabela 5 - Resultados do Teste F. 43
Tabela 6 - Valores reais e codificados para a resposta atividade antioxidante pelo método de FRAP. 46
Tabela 7 - Efeitos das variáveis frente à atividade antioxidante. 47
Tabela 8 - Resultados do Teste F. 48
Tabela 9 - Zonas de inibição dos extratos 7 e 8. 57
Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos 7 e 8. 58

SUMÁRIO

1 Introdução 14

2 Objetivos 15

2.1 Objetivo geral 15

2.2 Objetivos específicos 15

3 Revisão Bibliográfica 16

3.1 A Oliveira e o azeite de oliva 16

3.2 Métodos de extração do azeite de oliva 19

3.3 Resíduos gerados durante o processamento do azeite de oliva 21

3.3.1 Resíduos gerados durante a extração descontínua em sistemas de prensas 22

3.3.2 Resíduos gerados durante a extração contínua de três fases 22

3.3.3 Resíduos gerados durante a extração contínua de duas fases 23

3.4 Métodos de extração de compostos fenólicos 24

3.5 Compostos fenólicos no bagaço de azeitonas gerados a partir do processamento do azeite 26

3.6 Efeitos biológicos e antimicrobianos do bagaço de azeitonas gerados a partir do processamento do azeite 29

4 Material e Métodos 32

4.1 Obtenção das amostras 32

4.2 Preparo da amostra 32

4.3 Preparo dos extratos fenólicos 32

4.4 Delineamento Experimental 33

4.5 Análises 34

4.5.1 Determinação de compostos fenólicos 34

4.5.2 Atividade antioxidante 34

4.5.3 Ensaios Antitumorais 35

4.5.3.1 Linhagens celulares e cultivo celular 35

4.5.3.2 Cultura de glioma de rato 35

4.5.3.3 Cultura de Astrócitos 35

4.5.3.4 Teste de viabilidade celular pelo método de MTT 36

4.5.3.5 Teste de proliferação celular pelo método de Sulforodamina B (SRF). 36

4.5.4 Ensaios Antimicrobianos 37

4.5.4.1 Preparação das culturas bacterianas 37

4.5.4.2 Atividade antibacteriana por disco difusão 37

4.5.4.3 Atividade antibacteriana por determinação da concentração inibitória mínima (CIM)..... 37

4.5.4.4 Concentração bactericida mínima 38

4.6 Análise Estatística 38

5 Resultados e discussão..... 39

5.1 Planejamento Fatorial..... 39

5.1.1 Otimização da extração de compostos fenólicos 39

5.1.2 Atividade antioxidante pelo método de FRAP 45

5.2 Atividade antitumoral 50

5.2.1 Teste de viabilidade celular pelo método de MTT 50

5.2.2 Teste de proliferação celular pelo método de Sulforodamina B (SRF).... 52

5.2.3 Ensaio de citotoxicidade em astrócitos..... 55

5.3 Atividade antibacteriana 56

5.3.1 Atividade antibacteriana por disco difusão 56

5.3.2 Atividade antibacteriana por determinação da concentração inibitória mínima (CIM)..... 58

6 Conclusões..... 60

7 Perspectivas..... 61

8 Referências 62

1 Introdução

Estudos epidemiológicos relacionaram a baixa incidência de doença cardíaca (RUIZ-CANELA e MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2011; CLIFTON e KEOGH, 2017) e câncer (GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2017; MAALEJ et al., 2017; AYOUB et al., 2017) com o consumo de azeite de oliva, o que tem impulsionado o mercado consumidor, principalmente em regiões onde o consumo não era frequente. Devido ao grande mercado consumidor brasileiro para azeite, nos últimos dez anos, têm sido implementados projetos nos estados das regiões Sudeste e Sul para o desenvolvimento da cultura da oliveira, com o objetivo de reduzir a dependência de importação do azeite de oliva. Desde os anos 2011 até 2017 o Brasil foi o segundo maior importador de azeite de oliva no mundo (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2017). Os últimos registros de produção de oliveira no Rio Grande do Sul indicam que o estado é o maior produtor nacional, com aproximadamente 2,1 mil hectares de cultivo e estima-se que anualmente sejam plantados cerca de 400 novos hectares (SOBCZAK, 2013).

O processamento de azeite gera uma grande quantidade de resíduos (MIRABELLA et al., 2014; NAZIRI et al., 2014), dentre os quais se destaca o bagaço, que é um subproduto do processo da produção do azeite de oliva obtido de diferentes formas e composições, de acordo com o equipamento utilizado no processamento, da variedade da azeitona e do grau de maturação do fruto. Estima-se que a produção de bagaço de azeitona atinge 2.881.500 toneladas/ano no globo terrestre (RAVINDRAN e JAISWAL, 2016). A deposição destes resíduos pode ter efeitos nocivos ao meio ambiente devido ao seu elevado teor orgânico e fitotoxicidade, recorrente da alta concentração de compostos fenólicos, que são caracterizados pela dificuldade de degradação biológica, e pelo efeito antimicrobiano, afetando os processos de digestão anaeróbica (BHATNAGAR et al., 2014). Nos países europeus, onde se concentra 95% da produção mundial de azeite (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2017), os resíduos inerentes à produção de azeite são considerados um problema ambiental.

As alternativas para remediar este problema estão na utilização dos resíduos para geração de energia; no entanto, no caso do bagaço obtido no processo de extração de duas fases, o qual apresenta elevada umidade, há

maior dificuldade, pois a remoção da água torna o processo pouco rentável e oneroso. A extração do azeite residual por meio de solvente orgânico a partir de bagaço resultante do processo de duas fases, também implica em alto gasto energético na secagem; e, além disso, estudos indicam que como consequência das elevadas temperaturas aplicadas, formam-se hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no óleo obtido deste bagaço (ERGÖNÜL et al., 2013). Outras aplicações dos resíduos incluem o seu uso como fertilizantes orgânicos (INNANGI et al., 2017), ou suplementos alimentares para animais (YANIK, 2017). Apesar da valorização econômica resultante tanto da recuperação do azeite quanto da produção de energia, esses resíduos podem ser substancialmente valorizados a partir da extração de compostos fenólicos que, dada a sua ampla gama de bio-aplicações, podem contribuir na valorização deste resíduo, com significativa redução do impacto ambiental.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Otimizar a extração de compostos fenólicos do bagaço de azeite, obtido no processo de extração de duas fases, utilizando diferentes extratos metanólicos, e avaliar o potencial biológico destes.

2.2 Objetivos específicos

• Elaborar diferentes extratos metanólicos a partir do bagaço de duas fases;

• Avaliar teor de compostos fenólicos nos diferentes extratos;

• Selecionar os dois extratos com maior teor de compostos fenólicos para avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 A Oliveira e o azeite de oliva

A oliveira (*Olea europea* Linné), pertencente à família das oleáceas, foi introduzida na bacia do Mediterrâneo por fenícios e sírios, desde os primórdios da civilização, seu uso foi difundido pelos romanos na alimentação e através da utilização medicinal; sendo considerada uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem (MANDARINO et al., 2005). Com a descoberta da América, o cultivo das oliveiras se expandiu para além do Mediterrâneo pela introdução da oliveira de Sevilha no oeste da Índia. Atualmente o plantio de oliveiras continua em expansão para além do Mediterrâneo, até mesmo em locais distantes da sua origem, como o sul da África, Austrália, Japão, Brasil e China (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2017). A longevidade e rusticidade da oliveira distinguem esta árvore das demais; se o tronco for cortado, os rebentos existentes na base crescem e originam uma nova árvore, existindo assim árvores centenárias, onde seu desenvolvimento não é impedido em climas sub-áridos e nem em solos muito pobres (SANTOS e RAMOS, 1987).

Trata-se de uma árvore de porte médio, que raramente ultrapassa os seis metros de altura, com folha persistente e um tronco contorcido de casca grossa e ramos relativamente delgados. As folhas são compridas (3 a 9 cm de comprimento) e estreitas, e de cor verde escura na parte superior e verde acinzentada ou esbranquiçada na parte inferior. As flores, reunidas em cachos, são pequenas, brancas e aromáticas. Os frutos, denominados de azeitonas, são constituídos por um caroço que contém a semente e por uma camada externa, que pode ser destinado para consumo de mesa ou para extração de material lipídico, de acordo com seu rendimento em óleo. A azeitona é constituída em média por 50% de água, 1,6% de proteínas, 22% de óleo, 19,1% de carboidratos, 5,8% de celulose e 1,5% de minerais (MANDARINO, ROESSING e BENASSI, 2005). Devido a presença de oleuropeína, a azeitona apresenta sabor característico, forte e amargo, o que impede seu consumo direto, sendo necessário o uso de processos para a utilização na alimentação.

O material lipídico obtido a partir do fruto da oliveira é denominado azeite de oliva, pelo fato de ser oriundo do mesocarpo da azeitona ao invés da semente e extraído sob prensagem a frio.

O azeite de oliva é composto majoritariamente (98% do peso total) por triacilgliceróis e ácidos graxos livres. Os triacilgliceróis são ésteres que resultam da união de uma molécula de glicerol com três ácidos graxos livres. Os ácidos graxos são classificados conforme o número de carbonos que os compõem e o grau de saturação. O ácido graxo mais abundante no azeite é o oleico (C18:1), seguido do palmítico (C16:0), linoleico (C18:2) e esteárico (C18:0), os quais representam cerca de 88% da composição total de ácidos graxos. Em menor proporção estão presentes os ácidos linolênico (C18:3), lignocérico (C24:0), araquídico (C20:0) e o behênico (C22:0) (WABAIDUR et al., 2016; KRITIOTI et al., 2017; XIANG et al., 2017).

A fração minoritária é formada esterois, álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, ceras, compostos fenólicos, pigmentos, vitaminas, tocoferois e compostos voláteis. Os esterois podem ocorrer na forma livre ou esterificados a ácidos graxos (LUKIĆ et al., 2013), e o seu teor permite identificar a origem e a pureza de um azeite. A diminuição dos esterois durante o armazenamento tem sido relacionada com o aumento do valor do índice de peróxidos. O conteúdo total de esterois está relacionado com a acidez livre, sendo que os azeites com uma alta percentagem de acidez também apresentam altos conteúdos de esterois (LUKIĆ et al., 2013).

Os álcoois alifáticos são uma importante categoria dos componentes da fração minoritária que podem ser usados como critério de distinção dos diferentes tipos de azeite. As diversas concentrações dos diferentes álcoois são particularidades da variedade de azeitona e da região em que é produzido o azeite (XIANG et al., 2017). As ceras são ésteres de ácidos graxos com álcoois de cadeia longa de elevado ponto de fusão, que encontram-se na casca da azeitona e atuam na redução da perda de água pelo fruto. A elevada acidez dos azeites contribui para o aumento da quantidade de ceras, devido à esterificação de álcoois alifáticos com ácidos graxos livres (HADJ-TAIEB et al., 2012).

Os compostos fenólicos são os principais antioxidantes presentes no azeite de oliva, e seu consumo têm sido associado a um menor risco de doenças cardíacas e à prevenção do envelhecimento (VENEZIANI et al., 2018). Estes compostos estão relacionados com os atributos sensoriais do azeite, conferindo-lhes particularidades únicas. A composição destes compostos no

azeite é muito complexa, e a sua concentração difere segundo fatores extrínsecos e intrínsecos (HADJ-TAIEB et al., 2012).

Os hidrocarbonetos presentes em maior abundância no azeite são o esqualeno e o β-caroteno. O esqualeno é um hidrocarboneto insaturado que representa cerca de 40% da fração minoritária; e o β-caroteno é um dos carotenoides responsáveis pela cor e estabilidade do azeite, e também como um percursor da vitamina A (CAYUELA e GARCÍA, 2018).

Outro carotenoide presente no azeite de oliva é a luteína, que juntamente com o β-caroteno são os principais responsáveis pela cor amarelada dos azeites. As clorofilas também fazem parte dos pigmentos encontrados no azeite de oliva, tendo como principal componente a feofitina-a e feofitina-b. Estes pigmentos conferem características de cor verde escuro a verde negro às azeitonas e seus produtos.

As vitaminas lipossolúveis identificadas no azeite são: vitamina A, vitamina D, vitamina E e vitamina K. Dentre estas, se destacam os tocoferois, por serem precursores da vitamina E, por contribuir para a estabilidade do azeite devido sua ação como antioxidante (CAYUELA e GARCÍA, 2017).

Os azeites de oliva de alta qualidade apresentam um perfil de compostos voláteis constituídos, principalmente, por aldeídos, ésteres, álcoois e cetonas, que originam um aroma equilibrado com caraterísticas sensoriais verdes e frutados (ROMERO et al., 2015). Alguns destes compostos são formados por enzimas endógenas; no entanto, os azeites de qualidade inferior apresentam perfis de aroma complexo que compreendem um grande número de compostos voláteis originados pela oxidação química e por enzimas exógenas. Alguns destes compostos dão origem às notas sensoriais desagradáveis. Assim, o estudo dos compostos presentes na fração volátil do azeite fornece informações sobre suas características sensoriais (LUKIĆ et al., 2017; VENEZIANI et al., 2018).

3.2 Métodos de extração do azeite de oliva

Nos tempos bíblicos, a colheita das oliveiras estava ligada principalmente a obtenção do óleo, em que a prensa consistia em uma grande pedra achatada, cilíndrica, escavada na parte superior para formar uma espécie de bacia grande e rasa para conter as azeitonas. Outra roda de pedra era colocada na beirada, e, com ajuda de um jumento era girada ar redor da bacia, esmagando as azeitonas, e a polpa resultante era tratada para extrair o óleo. Outro método de obtenção do azeite consistia em colocar a polpa em cestos, um por cima do outro, e espremê-los juntos numa prensa, seja por meio de um parafuso de rosca ou um pedaço de madeira que funcionava como uma alavanca quando empurrada contra a estrutura de madeira (GOWER, 2012).

Outra alternativa era colocar a polpa das azeitonas em sacos de tecido que posteriormente seriam pisados; no entanto, devido a polpa ser dura, pouco óleo era extraído. O azeite saía através do tecido e era colocado em frascos até o sedimento decantar, efetuando então a separação. A colheita de uma árvore rendia cerca de 20 galões de óleo (GOWER, 2012).

Atualmente, existem dois métodos de extração distintos: o método tradicional utilizando prensa hidráulica, usado durante séculos; e o método de centrifugação com extração contínua, que a indústria oleícola adotou nas últimas décadas (BOLAÑOS et al., 2006).

No método tradicional a extração do azeite começa pela moagem das azeitonas (com caroço) em moinhos de pedra. Este moinho é formado por pedras de granito cônicas que se movimentam sobre as azeitonas, promovendo o esmagamento e liberação do azeite do interior dos vacúolos. No próprio moinho ocorre a etapa de malaxagem, que promove a união das pequenas gotas de azeite, dispersas na pasta de azeitona, formando gotas maiores, melhorando assim o rendimento de extração. A etapa de separação da fração sólida e líquida ocorre através de prensagem em um sistema descontínuo de prensas hidráulicas, onde a massa é adicionada a discos vazados, por onde o azeite é liberado, e a fração líquida é recolhida em um tanque de decantação (DI GIOVACCHINO, 2000; APARICIO e HARWOOD 2003; PETRAKIS, 2006). O processo de prensagem é demorado e ocorre de forma descontínua, além disto, durante o processo ocorre a deposição de massa de azeitona nas entranhas dos discos de prensagem, a qual é difícil de

ser removida mesmo com intensas lavagens, resultando na ocorrência de processos fermentativos e reduzindo a qualidade do azeite produzido.

A partir do método de centrifugação derivam dois sistemas distintos: o sistema de três fases e o sistema de duas fases. O sistema de centrifugação de três fases surgiu em substituição da clássica prensa hidráulica na década de setenta, e o sistema de extração de duas fases surgiu na década de noventa (BORJA et al., 2002).

No processo de extração por centrifugação a moagem das azeitonas ocorre em moinho de martelo, com posterior malaxagem, a qual é de extrema importância, uma vez que o moinho de martelos reduz o tamanho das gotas de azeite e dispersa as gotas em uma pasta emulsionada. A etapa de malaxação promove a quebra da emulsão fazendo com que haja a agregação das microgotas de azeite.

Em sistema contínuo de três fases são adicionados cerca de 50 a 100% de água à pasta de azeitona batida, de acordo com a relação de umidade inicial e umidade de trabalho. A pasta batida é conduzida a uma centrífuga decantadora horizontal para a separação do bagaço e da fração líquida constituída pelo azeite e água ruça (resíduo resultante da adição de água na etapa de malaxação e da água oriunda da própria azeitona). Após, a fração líquida é centrifugada em centrífuga vertical de pratos, onde a água ruça e o azeite são separados. A introdução do sistema de centrifugação de três fases levou a um significativo progresso no processo de extração de azeite e a uma importante modificação no conceito dos subprodutos obtidos, tanto em quantidade e características quanto no seu posterior aproveitamento (GOMEZ et al., 2010). A principal vantagem deste sistema é o aumento da produtividade, uma vez que o processo de extração é contínuo, e não há necessidade de transferir a pasta para os decantadores, o que reduz o custo de produção e permite uma completa automatização do processo.

O sistema de centrifugação contínua de duas fases surgiu com o principal objetivo de eliminação de águas ruças geradas durante a extração do azeite, o que se conseguiu com a introdução de centrífugas que, sem necessidade de adição de água, separam o azeite dos demais resíduos (ALBUQUERQUE et al., 2006). No sistema contínuo de duas fases é permitida a adição de talco, que é um material orgânico inerte adicionado na

etapa de malaxagem, com o objetivo de facilitar a quebra da emulsão e a extração. Após a malaxagem a pasta é colocada na centrífuga decantadora para separar o bagaço da fração líquida, que posteriormente, é centrifugada em centrífuga vertical, com finalidade de promover separação efetiva do azeite e da água vegetativa (oriunda da azeitona). Na Figura 1 são apresentados os três processos de extração de azeite.

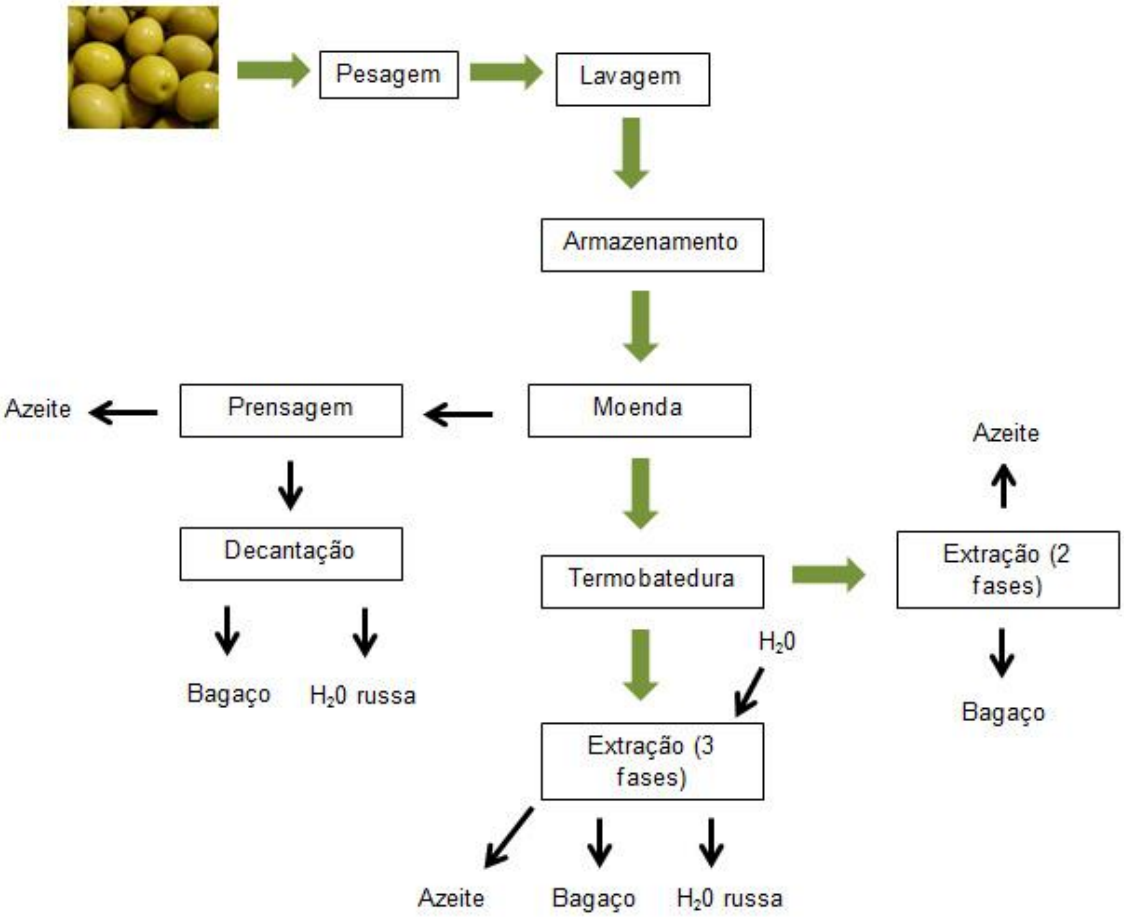


Figura 1 - Fluxograma da produção de azeite através dos diferentes tipos de extração.

3.3 Resíduos gerados durante o processamento do azeite de oliva

De acordo com Centre D´Initiative Pour la Production Prope- CIPP (2000), a partir de 100 kg de azeitona são produzidos cerca de 20 kg de azeite. Estas proporções podem variar segundo o sistema de extração utilizado. As características físico-químicas dos resíduos da extração do azeite variam de acordo com o método de extração, do seu tratamento subsequente, da variedade da oliva e das condições ambientais (VERA et al., 2009). Esses resíduos constituem uma mistura composta de alto percentual de água,

compostos orgânicos como azeite residual, fibras, açúcares, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, ácidos voláteis, tocoferois, pigmentos e de compostos inorgânicos (LAFKA et al., 2011).

3.3.1 Resíduos gerados durante a extração descontínua em sistemas de prensas

Neste processo de extração são gerados o bagaço e a água ruça. O bagaço é obtido dos capachos após a prensagem, sendo constituído pela casca, caroço e polpa da azeitona, bem como pelo material lipídico residual (8 a 10%), o qual pode ser extraído através de lavagem com solventes. O bagaço restante, depois de seco, pode ser queimado para a geração de energia ou para o aquecimento da água da termobatedeira.

A água ruça é resultante da separação por decantação, à qual é normalmente adicionada à água de lavagem da azeitona. O valor econômico deste resíduo é praticamente nulo, tornando-se um problema ambiental a ser resolvido pelos lagareiros. Em média, o processamento de azeitona gera entre 0,5 m^3 a 0,8 m^3 de água ruça por 1000 kg de azeitona processada (PAIXÃO et al., 1999; VITOLO et al., 1999). As características físico-químicas destas águas são dependentes de fatores como: variedade de azeitona, tipo de solo, sistema de cultivo, grau de maturação do fruto, tempo de armazenamento do fruto e principalmente pelo sistema de extração utilizado (FIORENTINO et al., 2003).

3.3.2 Resíduos gerados durante a extração contínua de três fases

O bagaço formado no sistema contínuo de três fases é constituído pela polpa, casca e caroço do fruto, contendo 25 a 50% de umidade e de 5 a 7% de azeite. Depois de secar o bagaço pode-se extrair o óleo residual, e utilizar como combustível (ARJONA et al., 1999). Quando ocorre separação do caroço, a eficiência da extração aumenta, o que permite destinar o caroço para a alimentação animal, como coadjuvante orgânico na compostagem, ou na produção de carvão ativado e furfural (RAMOS-SURIA, 1986).

A composição das águas ruças geradas no sistema contínuo de três fases, assim como a obtida por prensagem, é muito variável. De uma forma genérica, as águas ruças produzidas neste sistema são maioritariamente constituídas por água (83 a 94%), matéria orgânica (4 a 16%) e sais minerais

(0,4 a 2,5%) (RAMOS-CORMENZANA, 1996). As principais características deste efluente estão relacionadas ao seu caráter poluente, pois exibe elevada carga orgânica, bem como presença de compostos fenólicos, os quais são responsáveis pela coloração e pelas propriedades antimicrobianas e fitotóxicas (CAPASSO et al., 1995; PAIXÃO et al., 1999; CASA et al., 2003). No sistema contínuo de extração são adicionados entre 500 até 2000 L de água por tonelada de azeitona na etapa de malaxagem (SCIOLI e VOLLARO, 1997; DE MARCO et al., 2007), que juntamente com a água oriunda das azeitonas, formam volumes de águas ruças que variam de 1,1 m^3 a 1,4 m^3.

3.3.3 Resíduos gerados durante a extração contínua de duas fases

A consistência do bagaço gerado no sistema contínuo de duas fases se assemelha com uma lama espessa, contendo até 80% de tegumento de azeitona, incluindo a casca, polpa (30-35%) e caroço (30-35%). O bagaço da azeitona produzido neste sistema é considerando um poluente relevante devido á presença de uma grande quantidade de substâncias orgânicas, óleo, polifenois, proteínas e polissacarídeos (RAUTER et al., 2010, ALÚDATT et al., 2010). Neste bagaço, de forma genérica, o mineral presente em maior quantidade é o potássio, seguido do ferro, cobre e metais pesados (INAREJOS-GARCÍA e FREPAGNE, 2011). Este bagaço, ao contrário do azeite, apresenta a clorofila e seus derivados como o pigmento majoritário, além das antocianinas, as quais se acumulam em maiores quantidades em azeitonas de cor roxo-escuro.

Este bagaço poderá ser seco e utilizado na geração de energia elétrica, no entanto, devido a elevada umidade, há necessidade de alta energia aplicada, o que propicia a formação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, além de alto custo. Além disso, a presença de açúcares dissolvidos torna este bagaço pegajoso e de difícil secagem.

A produção de resíduos é inerente a qualquer indústria processadora de azeite de oliva; o tratamento e a eliminação de resíduos gerados na produção do azeite são considerados um problema ambiental nos países do Mediterrâneo, devido a maior produtividade. Embora no Brasil a produção de azeite não seja tão elevada, como nos restantes países da orla mediterrânica,

a poluição causada pela produção das águas ruças e dos bagaços assume relevância acrescida no impacto que exerce no meio ambiente.

Para contornar este problema ambiental relacionado aos resíduos gerados na produção de azeite de oliva é necessário estudar formas de viabilizar sua utilização, pois as alternativas tradicionais de valorização dos resíduos obtidos durante a extração de azeite, ainda não demonstram eficiência ou acarretam em altos custos para a empresa (DUARTE et al., 2017). Como estes resíduos apresentam potencial para agregação de valor econômico, não podem ser considerados como desperdícios.

3.4 Métodos de extração de compostos fenólicos

Há alguns anos têm-se pesquisado a extração de compostos bioativos a partir de materiais vegetais, existem inúmeros estudos acerca do assunto, sendo as técnicas de extração variadas, desde extrações com líquido pressurizado (MACHADO et al., 2015; PLAZA e TURNER, 2015), fluídos supercríticos (SILVA et al., 2016; BASA'AR et al., 2017), ultrassom (REZENDE et al., 2017), entre outros. Apesar destes métodos serem descritos como sendo menos poluentes comparados aos que utilizam solventes orgânicos, tornam-se muito dispendiosos devido aos equipamentos requeridos, assim, é necessário otimizar os processos extrativos para maior extração dos compostos alvo. As extrações líquido-líquido e sólido-líquido são comumente realizadas, utilizando solventes de característica polar, como água, álcoois (metanol e etanol), acetona e combinação de diferentes solventes (KHODDAMI, 2013).

A eficiência da extração é influenciada por fatores como o método de extração utilizado, a natureza química da planta, tempo de extração, temperatura, número de extrações utilizadas, tamanho das partículas, proporção entre solvente e amostra, condições de armazenamento e presença de substâncias interferentes.

O solvente a ser utilizado na extração deve estar de acordo com a polaridade do analito, também devem ser considerados a transferência de massa, segurança ambiental, utilização de co-solvente, toxicidade para humanos e viabilidade financeira na seleção do solvente de extração dos compostos fenólicos (COWAN, 1999). Os solventes comumente utilizados para extração de substâncias fenólicas são metanol e misturas de metanol/água

(TSAO, 2010; NOUR et al., 2014). Outros solventes tais como acetona, acetato de etila e misturas de solventes também têm sido utilizados, mas geralmente promovem baixo rendimento, a adição de água ao solvente contribui para criar um meio moderadamente polar, favorecendo a extração de polifenois (LAPORNIK et al., 2005; LIYANA-PATHIRANA et al., 2005).

A presença de um ácido no solvente de extração facilita a degradação do material vegetal e aumenta a taxa de extração de polifenois da matriz. Além do mais, a acidez do solvente de extração também pode afetar a composição química dos extratos (VIZZOTO e PEREIRA, 2011). De acordo com a literatura, concentrações (1-2 $mol.L^{-1}$) de ácidos minerais causam hidrólises de flavonoides glicosídeos, enquanto alguns compostos fenólicos lábeis presentes no mesmo material podem ser degradados sob tais condições severas (HAKKINEN et al., 1998).

Em amostras sólidas, a primeira etapa a ser realizada é a transferência do analito para a fase líquida que é o solvente extrator (CASTRO e CAPOTE, 2010), este processo é uma das metodologias mais antigas utilizadas no preparo de amostras, e é denominado extração sólido-líquido ou lixiviação (GARCIA-AYUSO, 1998; MILIC et al., 2013). Como exemplo de extração sólido-líquido, tem-se a maceração, largamente utilizada na obtenção de compostos fenólicos a partir de vegetais, em que é empregado calor e ou/agitação, de modo a acelerar a dissolução dos analitos no solvente extrator.

Temperaturas elevadas aumentam a eficiência da extração, uma vez que as paredes celulares são permeabilizadas, com aumento dos coeficientes de solubilidade e difusão dos compostos a serem extraídos e diminuição da viscosidade dos solventes, facilitando a passagem do solvente pela massa do substrato sólido e o processo subsequente de separação (filtração ou sedimentação). O tempo de extração é outro fator importante, quando a extração é conduzida por curtos períodos, esta pode ter eficiência reduzida, de forma que não há completa transferência dos solutos para a fase orgânica, no caso de longos períodos de extração pode ocorrer oxidação dos analitos.

O número de etapas de extração também exerce influência, quando se emprega um maior número de extrações a eficiência é aumentada, rendimentos quantitativos são obtidos somente quando 3 a 5 extrações sequenciais da amostra original são realizadas. De forma geral, a taxa de

extração aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da matriz sólida, devido ao aumento da área disponível para transferência de massa (PEREIRA e MEIRELES, 2010). Quanto menor a proporção entre a amostra e o solvente maior a transferência de massa entre ambos.

Os compostos fenólicos, para além de ser utilizados como suplementos alimentares ou alimentos funcionais, na prevenção de inúmeras doenças, a sua valorização garante a sustentabilidade ambiental (ALIAKBARIAN et al., 2015). Perante isto, existe uma grande necessidade de otimizar a técnica de extração para se obter os melhores rendimentos durante as extrações.

3.5 Compostos fenólicos no bagaço de azeitonas gerados a partir do processamento do azeite

O fruto da azeitona quando ainda imaturo possui composição fenólica formada majoritariamente de oleuropeína, verbascosídeo e ligstrosídeo. Durante a maturação do fruto é formado o hidroxitirosol (HT) e demais compostos fenólicos, como o tirosol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico e o alcool homovanílico (KOUNTOURI et al., 2007). Na produção do azeite, durante o esmagamento dos frutos, ocorre a mistura do conteúdo celular, de modo que a atividade de enzimas como α- glicosidase e esterase, polifenol oxidase, peroxidase e a lipoxigenase, promovam uma cadeia de reações que ocasionam alterações na estrutura molecular da oleuropeína e do listrosídeo, sendo originados os secoiridóides agliconas (INAREJOS-GARCÍA e FREGAPANE, 2011). Neste momento são formados os compostos HT e seus derivados, e o tirosol e seus derivados. Quanto mais prolongado for o tempo de malaxação, pode ocorrer pequena redução nos derivados da oleuropeína.

Durante a etapa de decantação do azeite os compostos fenólicos são distribuídos nas fases de acordo com sua afinidade química, e portanto, a maior parte dos compostos permanecem retidos no bagaço. O volume de água adicionada no processo extrativo influencia na concentração dos compostos fenólicos no bagaço, sendo que maiores volumes de água favorecem a separação dos polifenóis do azeite (GÓMEZ-GONZÁLEZ et al., 2010).

Os fatores agronômicos exercem influência no perfil fenólico das azeitonas, e consequentemente do azeite e do bagaço; em caso de estresse hídrico, ocorre maior concentração desses compostos (BAKHOUCHE et al.,

2013; GOUVINHAS et al., 2015). Os compostos mais afetados pela falta de irrigação são derivados de secoiridóide da oleuropeína e do ligstrosídeo.

O bagaço obtido do processamento da extração de azeite possui cerca de 98% do total do conteúdo fenólico das azeitonas inteiras, sendo que os 2% migram para o azeite (ALÚDATT et al., 2010). Assim, a quantidade de antioxidantes em resíduos da extração superam o conteúdo encontrado no azeite de oliva (SÁNCHEZ DE MEDINA, PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2012), e sua recuperação pode ter potenciais usos, não apenas na indústria de alimentos, mas também, por exemplo, em áreas farmacêuticas.

A maioria dos compostos fenólicos presentes no bagaço da extração de azeite se encontram na forma livre, representando 75% a 90% do conteúdo total, e o restante (10%-25%) se apresenta na forma ligada (ALÚDATT et al., 2010). Dentre os compostos fenólicos presentes no bagaço de azeite, são citados: secoiridóides, álcoois fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides (ZBAKHA e EL ABBASSI, 2012; ARAÚJO et al., 2015; LEOUIFOUDI et al., 2015). Os compostos fenólicos reportados como majoritários no bagaço da extração de azeite são o hidroxitirosol, oleuropeína, tirosol, ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido vanílico; além de flavonoides em menores concentrações (GARCÍA-VILLALBA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2015; LEOUIFOUDI et al., 2015).

Os compostos fenólicos classificados como secoiridóides resultam do metabolismo secundário dos monoterpenos, e estão presentes apenas nas plantas da família das Oleaceae. A oleuropeína (Figura 2) é um secoiridóide de gosto amargo, este composto foi isolado pela primeira vez em azeitonas por Bourquelot e Vintilesco em 1908. A oleuropeína consiste em um éster heterosídico do ácido elenoico e dihidroxietanol, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter, com peso molecular de 540,514 $g.mol^{-1}$.

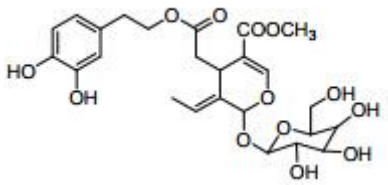


Figura 2 - Estrutura química da oleuropeína.

O álcool fenólico majoritário presente no bagaço é o HT (Figura 3), e em baixas concentrações, encontra-se o tirosol (Figura 4) (GONZÁLEZ-CORREA et al., 2010). O HT apresenta caráter anfipático, com peso molecular de 154,16 g/mol^{-1} e uma estrutura de feniletil-álcool, sendo também denominado de 3,4-di-hidroxifeniletanol pela IUPAC. O HT pode estar presente como um fenol simples ou esterificado com ácido elenoico, formando oleuropeína e sua forma aglicona (AMIOT et al., 1986; SERVILI et al., 1999); mas também pode estar presente como parte da molécula de verbascosídeo, e em várias formas glicosídicas, dependendo do grupo hidroxila ao qual o glicosídeo está ligado (BIANCO et al., 1998; RYAN et al., 2001).

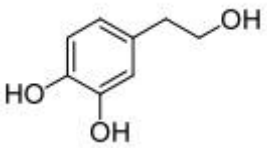


Figura 3 - Estrutura do hidroxitirosol.

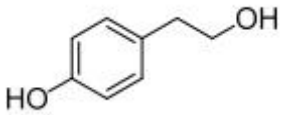


Figura 4 - Estrutura do tirosol.

A formação de HT ocorre a partir da ação de β-glicosidases endógenas sobre a molécula de oleuropeína durante o amadurecimento e processamento da azeitona (BOSKOU, 2008). De acordo com a Figura 5, se a oleuropeína sofrer uma quebra da ligação éster dará origem a hidroxitirosol e ácido elenóico, enquanto que, se houver uma quebra da ligação glicosídica, formar-se-ão oleuropeína aglicona e glicose (CHAROENPRSERT e MITCHELL, 2012).

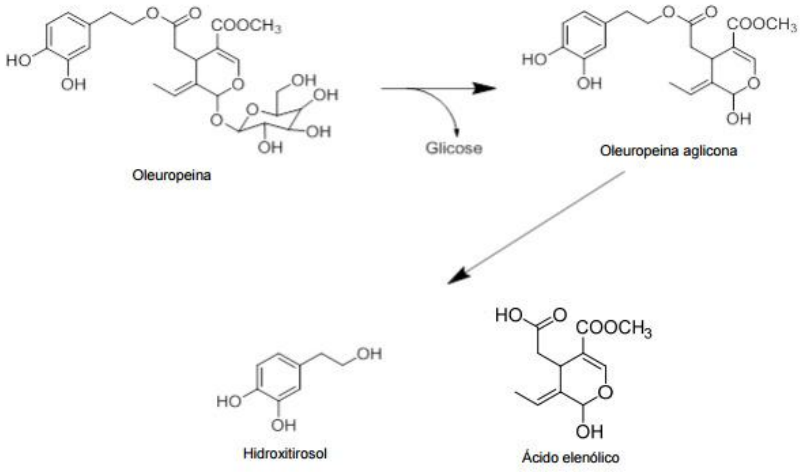


Figura 5 - Transformação química da oleuropeína.

3.6 Efeitos biológicos e antimicrobianos do bagaço de azeitonas gerados a partir do processamento do azeite

Os compostos fenólicos característicos do bagaço de azeite apresentaram efeito neuroprotetor, atuando na melhoria da permeabilidade da barreira hematoencefálica e edema cerebral em ratos (MOHAGHEGI et al., 2011), possuem atividade anti-hipertensiva (SUSALIT et al., 2011), ação protetora contra esteatose hepática em ratos (PARK et al., 2011), capacidade preventiva de oxidação de LDL no atraso do desenvolvimento de placas ateroscleróticas em modelos animais (GONZÁLEZ-SANTIAGO et al., 2010; OMAR, 2010), sugerindo a eficácia destes compostos no tratamento e prevenção da aterosclerose. Além disso, um estudo indica que estes polifenóis exercem efeitos críticos na formação e manutenção dos ossos e podem ser utilizados como medicamentos efetivos no tratamento de sintomas de osteoporose (HAGIWARA et al., 2011).

Outra pesquisa demonstrou através de exame microscópico de tecidos renais e hepáticos de ratos tratados com compostos fenólicos de bagaço de azeite na concentração de 1200 ppm apresentou o mesmo caráter histológico do que os ratos de controle, enquanto a administração de BHT (200 ppm) e outros compostos fenólicos (1600 ppm) induziu a danos severos aos tecidos de rim e fígado de rato (FARAG et al., 2003). Esses achados demonstram que os

compostos fenólicos do bagaço de azeite são seguros e não apresentam efeitos indesejáveis em comparação com os antioxidantes sintéticos.

O HT foi aceito pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) como protetor de lipídios no sangue contra danos oxidativos (VISIOLI, 2012), sendo reconhecido como alimento funcional, sendo indicado o consumo de 5 mg de HT e seus derivados (por exemplo, complexo oleuropeína e tirosol). Essas quantidades podem ser facilmente consumidas no contexto de uma dieta equilibrada (painel EFSA sobre Nutrição e Alergias de Produtos Dietéticos 2011).

O HT apresentou atividade antioxidante (COVAS et al., 2015; PEREZ-BONILLA et al., 2014; FABIANI, 2016; LÓPEZ DE LAS HAZAS et al., 2017), capacidade de inibir a oxidação lipídica em matrizes de alimentos durante o armazenamento e refrigeração (COFRADES et al., 2011), em nível extracelular, HT e derivados demonstraram capacidade de eliminação de ROS em células da pele, bloqueando os efeitos nocivos (ZWANE et al., 2012; FABIANI, 2016; LÓPEZ DE LAS HAZAS et al., 2017). O HT também possui atividades como: capacidade de eliminação de ROS intracelular, particularmente com moléculas de radicais livres, como superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, além de atuar como um quelante de metais (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2012; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2014), atividade antiaterogênica (BERNINI et al., 2013; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2014; RODRIGUEZ-MORATO et al., 2015), anti-plaquetária e anti-inflamatória (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010).

Além disso, o HT apresentou efeito contra a fibrose pulmonar em um modelo induzido em ratos (LIU et al., 2015). É notável que o HT tem capacidade de induzir enzimas que poderiam melhorar alguns distúrbios neurodegenerativos como a doença de Parkinson (DEXTER e JENNER, 2013). A oleuropeína e hidroxitirosol demonstraram atividade antiangiogênica (SCODITTI et al., 2012), inibindo a criação de uma rede de interação circundante que fornece o microambiente necessário para a crescimento de células tumorais malignas, migração e invasão (BARBARO et al., 2014). Além disso, o HT e a oleuropeína foram reportados com atividade inibitória do início do processo de câncer e sua progressão em diferentes estágios, protegendo contra o dano oxidativo do DNA, modulação da biossíntese dos promotores de

câncer, modulação de genes envolvidos na proliferação celular e efeitos imunomoduladores (ESCRICH et al., 2007). Sendo que o principal efeito protetor contra o câncer é devido à capacidade de diminuir o estresse oxidativo nas células (BARBARO et al., 2014). O HT diminuiu o volume e o crescimento de tumor e a proliferação celular em ratos com tumores mamários (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2011). Outros estudos demonstraram que tanto a HT como os seus derivados podem exercer efeitos protetores contra múltiplos tipos de câncer, tais como pâncreas, cavidade oral, esôfago, cólon, próstata ou pulmão (RAFEHI et al., 2012; VILAPLANA-PEREZ, et al., 2014).

O comportamento antibacteriano de resíduos de azeite no solo impulsionou pesquisas referentes ao potencial antibacteriano de seus principais compostos fenólicos frente a bactérias de ocorrência em alimentos, afim de averiguar a possibilidade de reaproveitamento através da aplicação em produtos e embalagens alimentícios. A primeira pesquisa a relatar a oleuropeína como potencial agente antimicrobiano foi desenvolvida por Fleming e Etchells (1967), a qual mostrou que a oleuropeína aglicona (150 $\mu g/mL^{-1}$) apresentou efeito inibitório contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em ensaio de disco difusão. Posteriormente, o primeiro relato da possível aplicação de oleuropeína como aditivo alimentar foi realizado por Tassou e Nychas (1994). De acordo com Serra (2008), a oleuropeína apresentou atividade antibacteriana no ensaio de microdiluição em caldo, no tempo de 24 h de tratamento, houve inibição de *Escherichia coli*, nas concentrações de 500 e 700 mg/mL^{-1}, acima de 500 mg/mL^{-1}, a oleuropeína promoveu inibição total do crescimento de *Bacillus cereus*. Belaqziz et al. (2017) testaram a atividade antibacteriana da oleuropeína contra *Staphylococcus aureus* pelo método de microdiluição em caldo e obtiveram concentração inibitória mínima de 62,5mg/mL^{-1}.

Tafesh et al. (2011) demonstraram que o HT inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* em um ensaio de microdiluição de caldo na concentração de 400 $\mu g/mL^{-1}$. Medina-Martínez et al. (2016) constataram que o HT apresentou concentração inibitória mínima de *Pediococcus acidilactici*.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção das amostras

As amostras de bagaço resultante da extração do azeite pelo método de duas fases foram fornecidas por uma propriedade produtora de oliveira, localizada na cidade de Pinheiro Machado - RS (Latitude: 31º 34' 42" S Longitude: 53º 22' 52" W). A cultivar utilizada no processamento foi a Arbequina, considerada uma das cultivares de melhor adaptação no estado, obtida no período de março de 2017, correspondente à época de colheita e processamento dos frutos. O bagaço foi acondicionado em caixa térmica e conduzido ao laboratório de Cromatografia do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, onde foi armazenado em ultrafreezer (-80ºC) até o momento da liofilização.

4.2 Preparo da amostra

O bagaço foi seco em liofilizador TELABE – J.D.F. LF.10/BFC e posteriormente processado em moinho de bolas até obtenção de um pó fino e homogêneo, após, este foi novamente liofilizado para remoção da umidade residual.

4.3 Preparo dos extratos fenólicos

O preparo dos extratos fenólicos do bagaço foi realizado segundo a metodologia descrita por Swain e Hillis (1959), com adaptações. Foram pesadas 0,7 g de amostra liofilizada em tubo de centrífuga, efetuada a lavagem com 10 mL de hexano, a qual foi repetida três vezes para remoção do azeite residual, após a amostra foi mantida por duas horas à temperatura ambiente para ocorrer a evaporação. Posteriormente, a pesagem foi ajustada para 0,5 g de amostra, onde foram adicionados 5 mL de solvente (metanol e água) nas diferentes concentrações. Após, as amostras foram submetidas a maceração com agitação em banho-maria nos respectivos tempos e temperaturas de extração. Decorridos os tempos de extração, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 7.000x*g*, e os sobrenadantes filtrados em papel filtro *Whatman* nº4 e avolumados em 20 mL com os respectivos solventes. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar a temperatura de -80 ºC até o momento das análises.

4.4 Delineamento Experimental

O delineamento experimental (Tabela 1 e 2) consistiu no experimento I e II, em que o primeiro teve como objetivo otimizar a extração dos compostos fenólicos e verificar a influência das variáveis na atividade antioxidante, e o segundo avaliar o potencial biológico dos dois extratos com maior concentração de compostos fenólicos.

Experimento I

Foi realizado um delineamento composto central (DCC), frente às variáveis dependentes (conteúdo fenólico total (CTF) e atividade antioxidante (AA)), incluindo 3 pontos centrais, totalizando 22 ensaios (Tabela 1). A utilização dos pontos centrais permite estimar o erro experimental e testar a adequabilidade do modelo de primeira ordem.

Tabela 1 - Níveis e variáveis independentes analisadas

Ensaios	X_1	X_2	X_3	Concentração de solvente	Temperatura	Tempo
1	-1	-1	-1	40%	45 ºC	60
2	+1	-1	-1	80%	45 ºC	60
3	-1	+1	-1	40%	70 ºC	60
4	+1	+1	-1	80%	70 ºC	60
5	-1	-1	+1	40%	45 ºC	180
6	+1	-1	+1	80%	45 ºC	180
7	-1	+1	+1	40%	70 ºC	180
8	+1	+1	+1	80%	70 ºC	180
9	0	0	0	60%	57,5 ºC	120
10	0	0	0	60%	57,5 ºC	120
11	0	0	0	60%	57,5 ºC	120

Experimento II

No experimento dois foi aplicado um delineamento composto pelas variáveis independentes e dependentes totalizando 30 determinações (2 extratos x 5 análises x 3 triplicatas), o qual é apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis dependentes e independentes do experimento 2

Variáveis Dependentes	Variáveis Independentes
2 Extratos	Viabilidade Celular (MTT) Proliferação Celular (Sulforodamina B) Atividade Antimicrobiana (Disco Difusão, CIM e CBM)

4.5 Análises

4.5.1 Determinação de compostos fenólicos

A análise de compostos fenólicos foi realizada seguindo o método de Swain e Hillis (1959), com adaptações. Adicionou-se 250 µL de extrato, 4000 µL de água, 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu (0,25 $mol.L^{-1}$) em tubo de centrífuga e deixou-se reagir por 3 minutos. Posteriormente foi adicionado 500 µL de carbonato de sódio 1,0 $mol.L^{-1}$. Após 2 horas de reação realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Jenway 6705 UV/VIS) no comprimento de onda de 725 nm. Para a quantificação, foi construída uma curva de concentração de padrão de ácido gálico, com leitura de absorbância a 725 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por kg de amostra.

4.5.2 Atividade antioxidante

A fim de verificar a capacidade dos compostos presentes nos extratos metanólicos de doarem elétrons, foi utilizado o ensaio de atividade antioxidante através da capacidade redutora de ferro (FRAP). A análise foi conduzida de acordo com o método descrito por Silva (2013), com poucas modificações.

Primeiramente foi preparada uma solução complexante de Fe^{3+} (reagente FRAP) na proporção 1:1:10, misturando-se 2500 µL de solução de TPTZ (2,4,6- tripiridil-1,3,5-triazina) 10 mM e 2500 µL de solução de cloreto férrico 20 mM em 25,0 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,25 M, (pH = 3,5). Foram misturados 100 µL da amostra na concentração de 25 $mg.mL^{-1}$ em 300 µL de água mili-Q, e em seguida foi adicionado 3000 µL do reagente FRAP. Após a reação foi conduzida sob aquecimento em temperatura de 37 ºC por 30 minutos, e a redução do complexo de Fe^{3+} para Fe^{2+} foi obtida através da leitura da absorbância no comprimento de onda a 595 nm (Jenway 6705 UV/VIS). Para a quantificação, foi construída curva de concentração de padrão de trolox, com leitura de absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em miligramas por kg de amostra.

4.5.3 Ensaios Antitumorais

4.5.3.1 Linhagens celulares e cultivo celular

4.5.3.2 Cultura de glioma de rato

A linhagem de células de glioma de rato C6 foi obtida a partir da ATCC (American Type Cell Collection; Rockville, Maryland, USA). Células de 10-20 passagens foram cultivadas em frascos de cultura e mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), pH 7,4, contendo 1% de DMEM (Gibco BRL), 8,4 mM de HEPES, $NaHCO_3$ 23,8 mM, 0,1% de fungizona, penicilina/estreptomicina a 0,5 U/mL e suplementado com 5% (v/v) de FBS (*Fetal Bovine Serum*). As células foram mantidas à 37 °C, com umidade relativa mínima de 95%, e atmosfera de 5% de CO_2.

4.5.3.3 Cultura de Astrócitos

A cultura de astrócitos foi preparada a partir de córtex de ratos Wistar recém-nascidos (1-2 dias de idade), os quais foram removidos e dissociados mecanicamente em uma solução salina equilibrada livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (CMF), com pH 7,4, (NaCl 137 mM, KCl 5,36 mM, Na_2HPO_4 0,27 mM, KH_2PO_4 1,1 mM, e glicose 6.1 mM). Após a centrifugação a 1000*x*g, durante 10 minutos, o pelete foi suspenso em DMEM suplementado com FBS a 10%. As células (5 x 10^4) foram semeadas em placas revestidas por poli-L-lisina de 96 poços múltiplos. As culturas foram mantidas em crescimento até a confluência por 20-

25 dias. O meio foi substituído a cada 4 dias. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo seguiram os "Princípios de *Animal Care Laboratory*" dos Institutos Nacionais de Saúde, e foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFPel (protocolo número 10321).

4.5.3.4 Teste de viabilidade celular pelo método de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pela redução de MTT, em que os extratos foram rotaevaporados a pressão reduzida para a remoção do solvente, e a seguir foram liofilizados. Após, os extratos foram pesados, para o cálculo do rendimento. O extrato liofilizado foi ressuspendido em água ultrapura nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu g.mL^{-1}$. Após 24 horas as células de glioma e astrócitos foram tratadas com os extratos nas respectivas concentrações a 37 ºC em 5% de CO_2 em 48 e 72 horas. O meio foi removido e 50 µL do corante MTT foram adicionados aos poços. O controle utilizado foi dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% na ausência dos extratos. As placas foram incubadas a 37 ºC com 5% de CO_2 durante 2 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan violeta foram solubilizados em 100 µL de DMSO. A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, EUA) a 490 nm. Todas as leituras foram comparadas com o controle, o que representa 100% de viabilidade. A análise foi efetuada em triplicata. O resultado foi expresso em percentual de inibição celular (%) de acordo com a absorbância, obtendo-se o percentual de viabilidade celular.

4.5.3.5 Teste de proliferação celular pelo método de Sulforodamina B (SRF)

Após o término do tratamento, as células foram lavadas e tratadas com ácido tricloroacético a 50% v/v por 30 minutos e mantidos em geladeira para a fixação. Decorrido esse tempo, o ácido foi retirado e foram efetuadas 5 lavagens com água para a retirada total do reagente. Após, foi adicionada solução de sulfarodamina B 0,4% v/v em ácido acético por 15 minutos para corar as proteínas. Em seguida, a solução foi retirada e foram realizadas 5 lavagens dos poços com ácido acético a 1% v/v para promover a total retirada do corante não complexado com as proteínas. Por fim, as placas foram submetidas a uma solução de Tris a 10 mM e a leitura realizada em

espectrofotômetro (Spectra Max 190/ Molecular Devices) a um comprimento de onda de 630 nm.

4.5.4 Ensaios Antimicrobianos

4.5.4.1 Preparação das culturas bacterianas

Para os ensaios antimicrobianos, foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC) três culturas de micro-organismos: *Escherichia coli* (ATCC 43895), *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) e *Salmonella ssp* (ATCC 7644). A partir de uma cultura microbiana congelada, o isolado foi reativado pela transferência de uma alçada desta cultura para Caldo BHI, o qual foi incubado a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação uma alçada foi transferida e estriada para a obtenção de colônias isoladas em placas de Ágar Triptona de Soja (TSA), as quais foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. A partir das culturas crescidas em TSA foi retirada uma alçada e ressuspendida em solução salina (NaCl 0,85%) a qual foi padronizada na concentração 0,5 da escala de McFarland ($1,5x10^8$ UFC/mL) através de comparação visual e diluição da solução salina inoculada.

4.5.4.2 Atividade antibacteriana por disco difusão

Foi preparado um inóculo para cada micro-organismo em solução estéril de NaCl 0,85% de acordo com a escala de Mc Farland ($1,5 x10^8$). Foram utilizados discos de papéis com 6 mm de diâmetro embebidos com 20 µl dos extratos sobre a placa de ágar Müller Hinton e incubadas a 37 ºC durante 24 horas. Após, foi observada a presença de halos de inibição, os quais foram determinados com o auxílio de um paquímetro.

4.5.4.3 Atividade antibacteriana por determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram adicionados em microplacas de 96 cavidades, caldo BHI, 20 µL dos inóculos dos micro-organismos testados e subsequentes diluições dos extratos rotaevaporados e ressuspendidos em água. Para os controles foram usados caldo BHI, sendo adicionado extrato para controle negativo e inóculo bacteriano para controle positivo; além disso, foram realizados brancos para cada concentração de extrato, sendo a microplaca incubada por 16-18 horas à

37 ºC. A densidade óptica a 630 nm (DO630) foi medida em 0 e 24 horas de incubação, utilizando espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Devices), e a atividade antibacteriana foi avaliada como a diferença entre a DO630 ao final das 24 horas e do início do período de incubação (0 horas). A CIM foi determinada como a menor concentração de extrato capaz de restringir o crescimento bacteriano.

4.5.4.4 Concentração bactericida mínima

A partir do resultado da CIM foi realizada a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), definida como a menor concentração de extrato do capaz de inibir 99,9% do inóculo bacteriano. Foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar BHA (Brain Heart Infusion Agar) e incubados por 24 horas a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas em que não houve crescimento bacteriano.

4.6 Análise Estatística

O tratamento dos resultados obtidos no experimento I foi realizado com a aplicação da ferramenta estatística superfície de resposta através do software Statistica 7.0. No experimento II, os resultados foram expressos como média e analisados mediante ANOVA (One-Way), seguido de teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism 5. Os resultados foram considerados como significativos quando $p<0,05$.

5 Resultados e discussão

5.1 Planejamento Fatorial

5.1.1 Otimização da extração de compostos fenólicos

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta estatística utilizada para encontrar o melhor conjunto de variáveis independentes ou fatores que produzem a resposta ideal. Em contraste com os procedimentos tradicionais univariados, em que cada variável é estudada separadamente, os sistemas multivariados fornecem mais informações sobre as variáveis e suas interações, por um número reduzido de ensaios (CANDIOTI et al., 2014). Neste estudo, a otimização do processo de extração de CFT de bagaço da extração de azeite foi estudada através do uso de planejamento fatorial 2^3, tendo como variáveis independentes a concentração do solvente, temperatura e tempo de extração.

A realização de repetições pode ser considerada um problema principalmente pelo grande número de experimentos que devem ser feitos para cada variável acrescentada. Para superar esse problema e obter boa estimativa de erros, foram incluídos três experimentos no centro do planejamento (pontos centrais), onde os níveis médios de todas as variáveis foram empregados. Assim, foi possível avaliar a significância dos efeitos e verificar a falta de ajuste. Desta forma, o número de repetições é significativamente reduzido (TEÓFILO e FERREIRA, 2006 *Apud* OLIVEIRA, 2009) e limita-se ao ponto central. Conforme ilustrado na Tabela 3, as concentrações de CFT variaram de 20886,2 a 23061,2 mg de ácido gálico. kg^{-1}.

Tabela 3 - Valores reais e codificados para a resposta concentração de compostos fenólicos

Ensaio	Concentração (%)	T (ºC)	Tempo (min)	Experimental (mg de ácido gálico.kg^{-1})	Predito (mg de ácido gálico.kg^{-1})	Desvios
1	-1(40)	-1(45)	-1(60)	21224,4	21051,6	0,81
2	+1(80)	-1(45)	-1(60)	21231,5	21158,6	0,34
3	-1(40)	+1(70)	-1(60)	20886,2	20918,2	-0,15
4	+1(80)	+1(70)	-1(60)	21088,9	20811,2	1,31
5	-1(40)	-1(45)	+1(180)	21652,4	21662,0	-0,04
6	+1(80)	-1(45)	+1(180)	22024,3	21769,0	1,15
7	-1(40)	+1(70)	+1(180)	23061,2	22865,9	0,84
8	+1(80)	+1(70)	+1(180)	22809,4	22758,9	0,22
9	0(60)	0(57,5)	0(120)	21330,0	21624,5	-1,38
10	0(60)	0(57,5)	0(120)	21263,9	21624,5	-1,69
11	0(60)	0(57,5)	0(120)	21296,9	21624,5	-1,53

De acordo com a Tabela 3, a maior concentração de compostos fenólicos foi obtida no ensaio 7 (23061,2 mg de ácido gálico.kg^{-1}), no qual a concentração de metanol foi de 40% (nível -1), a temperatura de 70 ºC (nível +1) e tempo de 180 minutos (nível +1); seguido do ensaio 8, no qual foi obtida a concentração de 22809,4 mg de ácido gálico.kg^{-1}. O menor rendimento foi obtido no ensaio 3 (20886,2 mg de ácido gálico.kg^{-1}), no qual a concentração estudada foi de 40% (-1), a temperatura de 70ºC (+1) e o tempo de 60 minutos (-1). Resultados semelhantes foram reportados em um estudo que avaliou a eficácia do ultra-som na extração de CFT do bagaço de azeitona, sendo encontrado 22020 mg de ácido gálico.kg^{-1} (GOLDSMITH et al., 2018).

Foram determinados os efeitos das variáveis sobre o rendimento global da extração (Tabela 4). Para isso, foram considerados modelos lineares com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4 - Efeitos das variáveis frente a resposta CTF

Fator	Efeito	Valor de p
Média	21624,5	0,0000
Conc (%)	82,5	0,0717
Temperatura	428,3	0,0029
Tempo	1279,1	0,0003
Conc (%) x Temperatura	-107,0	0,0445
Conc (%) x Tempo	-22,4	0,4385
Temperatura x Tempo	668,7	0,0012

*significância estatística p<0,05; conc (%)= concentração %; Temperatura em ^{o}C; Tempo em min.

De acordo com a Tabela 4, os resultados significativos podem ser observados a partir do valor de p, em que todos os valores menores que 0,05 são significativos. O valor de p é a probabilidade de se observar um valor da estatística de teste maior ou igual ao encontrado (FERREIRA e PATINO, 2015). Este valor é utilizado para avaliar a significância dos coeficientes, de forma que, quanto menor for o valor de p, maior a significância do coeficiente de variação.

Duas variáveis, das três estudadas, exerceram efeito positivo e significativo sobre a resposta CFT. Quando a temperatura foi elevada do nível -1 (45 ºC), ao +1 (70 ºC) ocorreu um aumento no efeito de 428,28 (Tabela 4). Isso se justifica porque a temperatura elevada favorece o processo de transferência de massa, levando à redução da viscosidade do solvente e facilitando a penetração do solvente, além de favorecer a degradação da matriz e da estrutura celular, o que torna as células mais permeáveis (TABARAKI et al., 2012; LIU et al., 2013). Além disso, ocorre o enfraquecimento das interações entre compostos fenólicos e proteínas, e entre compostos fenólicos e polissacarídeos, aumentando assim a taxa de difusão. Yuan et al., (2018) observaram resultados semelhantes na otimização de extração de compostos fenólicos de resíduos de avelã provenientes de Oregon, nos Estados Unidos através de maceração.

Quando o tempo de extração foi aumentado do nível -1 (60 min) para o nível +1 (180 min), também ocorreu aumento do efeito, sendo este de 1279,1. Isso pode ser justificado pelo aumento do tempo de contato entre o solvente e a amostra, o que propicia maior penetração do solvente e, consequentemente, favorece a extração dos compostos fenólicos. De acordo com Yingngam, Supaka e Rungseevijitprapa (2015), tempos reduzidos de extração não permitem a penetração eficiente do solvente no extrato, impedindo a extração dos compostos de interesse. Alguns estudos corroboram com estas constatações, pois foi observado aumento no teor de CFT pelo aumento do tempo de extração (SUN et al., 2011; DENT et al., 2013; CHEN et al., 2018).

A interação entre a concentração de metanol e a temperatura apresentou efeito negativo e significativo. Este comportamento pode estar relacionado à redução da constante dielétrica da mistura da solução aquosa com a elevação da temperatura, fator que reduz a polaridade do solvente, resultando em menor extração de compostos fenólicos (JOVANOVIC et al., 2017 ; CHIANG et al., 2017). A interação entre concentração e tempo não foi significativa , no entanto, interação entre a temperatura e o tempo de extração apresentou efeito positivo na extração dos compostos fenólicos. Com o aumento do tempo de extração e o aquecimento da amostra, ocorreu o enfraquecimento da integridade da parede celular, promovendo maior extração

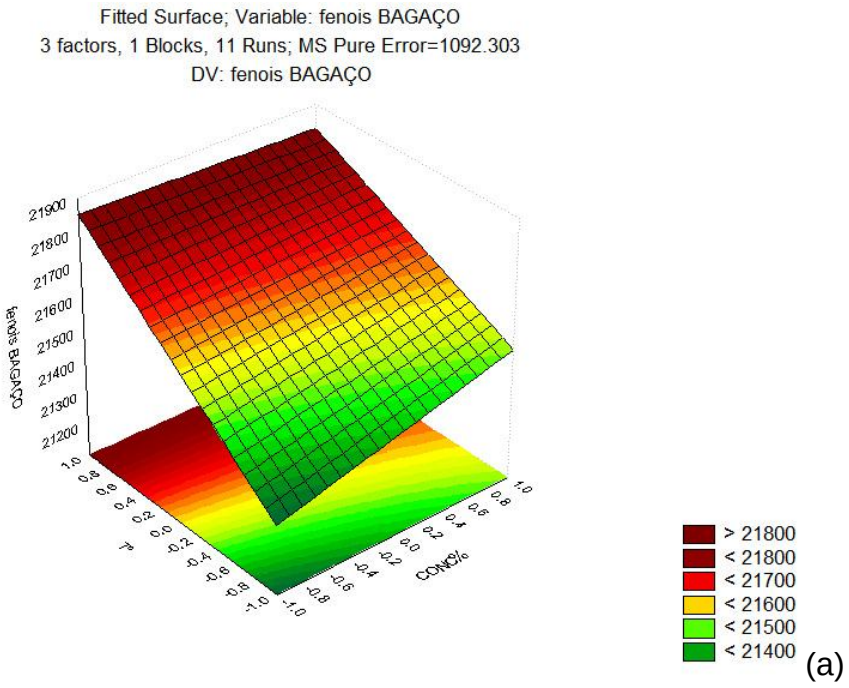
desses compostos, devido ao aumento da solubilidade com o solvente (LIU et al., 2013).

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de primeira ordem, que descreve a CTF em função das variáveis independentes (concentração, temperatura e tempo). O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 5), em que se obteve um coeficiente de correlação de 0,94, indicando que o modelo foi significativo. Os valores de F_{calc} de 583,19 e F_{tab} de 4,46 (Tabela 5), demonstram que o modelo foi preditivo, permitindo assim a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 6.

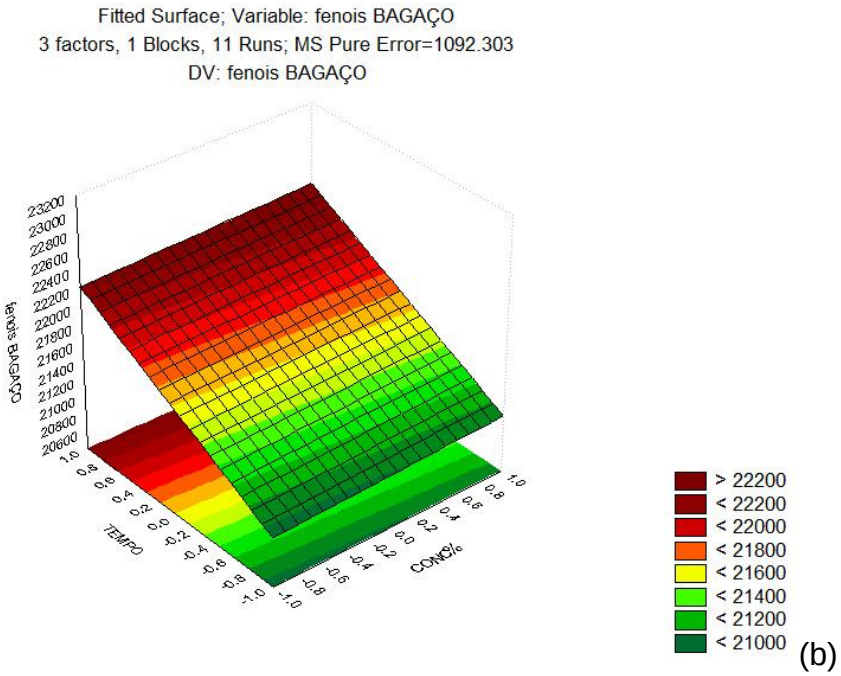
$$21624{,}46 + 214{,}14T^{\circ} + 639{,}54tempo - 53{,}51con.T^{\circ} + 334{,}34T^{\circ}.tempo \qquad (1)$$

Tabela 5 - Resultados do Teste F

Fonte variação	GL	SQ	QM	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$
Regressão	8	5097096	637137	583,19	4,46
Resíduo	2	2185	1092,5		
Total	10	5099281			



(a)



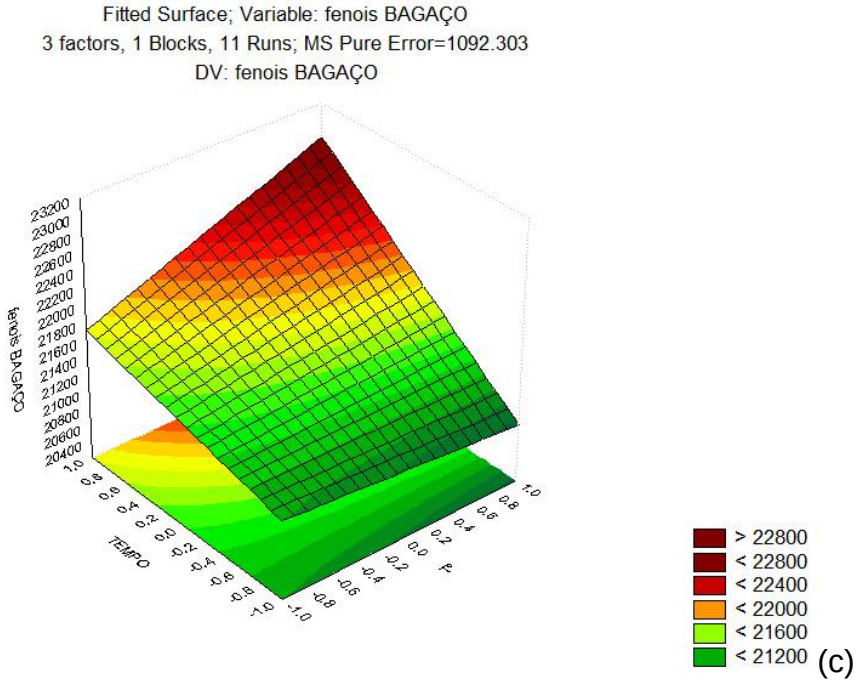


Figura 6 - Superfícies de resposta das variáveis TºC x concentração % (a), tempo (min) x concentração % (b) e tempo (min) x TºC (c).

5.1.2 Atividade antioxidante pelo método de FRAP

No ensaio de FRAP, quanto maior a capacidade do extrato de reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+}, mais intensa é a mudança da cor verde-amarelada para tons de azul, devido à presença de antioxidantes que promovem a conversão do complexo-Fe^{3+} à forma ferrosa (Fe^{2+}). Ao se medir a intensidade da cor azul no comprimento de onda de 595 nm, é possível quantificar a redução de Fe^{3+} promovida pelo extrato. As propriedades de redução são geralmente associadas com a presença de redutores, que têm demonstrado exercer ação antioxidante, pela quebra da reação em cadeia dos radicais livres por doação de um átomo de hidrogênio (SHIMADA et al., 1992).

De acordo com a Tabela 6, a maior atividade antioxidante pelo método de FRAP foi obtida no extrato 5 (20405,5 mg de trolox.kg^{-1}), no qual a concentração de metanol foi de 40% (-1), a temperatura de 45 ºC (-1) e tempo de 180 minutos (+1). A menor atividade antioxidante foi obtida no extrato 6 (2711,8 mg de trolox.kg^{-1}), no qual a concentração de metanol foi de 80% (+1), a temperatura de 45 ºC (-1) e o tempo de 180 minutos (+1).

Tabela 6 - Valores reais e codificados para a resposta atividade antioxidante pelo método de FRAP

Ensaio	Concentração (%)	T (ºC)	Tempo (min)	Experimental (mg de trolox.kg^{-1})	Predito (mg de trolox.kg^{-1})	Desvio
1	-1(40)	-1(45)	-1(60)	18772,4	19170,9	-2,1
2	+1(80)	-1(45)	-1(60)	18124,6	14550,6	19,7
3	-1(40)	+1(70)	-1(60)	19443,9	16246,5	16,4
4	+1(80)	+1(70)	-1(60)	19253,8	20028,9	-4,0
5	-1(40)	-1(45)	+1(180)	20405,5	17208,0	15,7
6	+1(80)	-1(45)	+1(180)	2711,8	3487,0	-28,6
7	-1(40)	+1(70)	+1(180)	13884,9	14283,5	-2,9
8	+1(80)	+1(70)	+1(180)	12539,5	8965,4	28,5
9	0(60)	0(57,5)	0(120)	10510,8	14242,6	-35,5
10	0(60)	0(57,5)	0(120)	10939,0	14242,6	-30,2
11	0(60)	0(57,5)	0(120)	10082,5	14242,6	-41,3

Foram determinados os efeitos das variáveis sobre a capacidade antioxidante pelo método de FRAP (Tabela 7). Para isso, foram considerados modelos lineares com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7 - Efeitos das variáveis frente à atividade antioxidante

Fator	Efeito	Valor de p
Média	14242,6	0,00008
Conc (%)	-4969,3	0,00369
Temperatura	1276,9	0,05190
Tempo	-6513,3	0,00215
Conc (%) x Temperatura	4201,5	0,00551
Conc (%) x Tempo	-4550,3	0,00440
Temperatura xTempo	376,6	0,33962

*significância estatística p<0,05; conc (%)= concentração %; Temperatura em ^{o}C; Tempo em min.

De acordo com a Tabela 7, a variável que apresentou efeito mais expressivo foi o tempo; quando este foi elevado do nível -1 (60 min) ao +1 (180 min) ocorreu redução da AA de 6513,26, provavelmente porque em períodos de extração mais prolongados ocorreu maior degradação de compostos que apresentam atividade antioxidante.

A variável temperatura apresentou valor de p>0,05; e portanto, não apresentou significância estatística. A concentração de solvente exerceu efeito negativo sobre a resposta AA, quando esta foi aumentada do nível -1 (40%) ao nível +1 (80%), houve redução da AA em 4969,28.

A interação entre concentração e temperatura apresentou efeito positivo frente à resposta AA pelo método de FRAP. Assim como, a interação entre concentração e tempo apresentou efeito negativo; resultados semelhantes foram reportados em trabalhos anteriores (THOO et al., 2013; AYBASTIER et al., 2013). No entanto, a interação entre a temperatura e tempo não apresentou efeito significativo frente a resposta AA pelo método de FRAP.

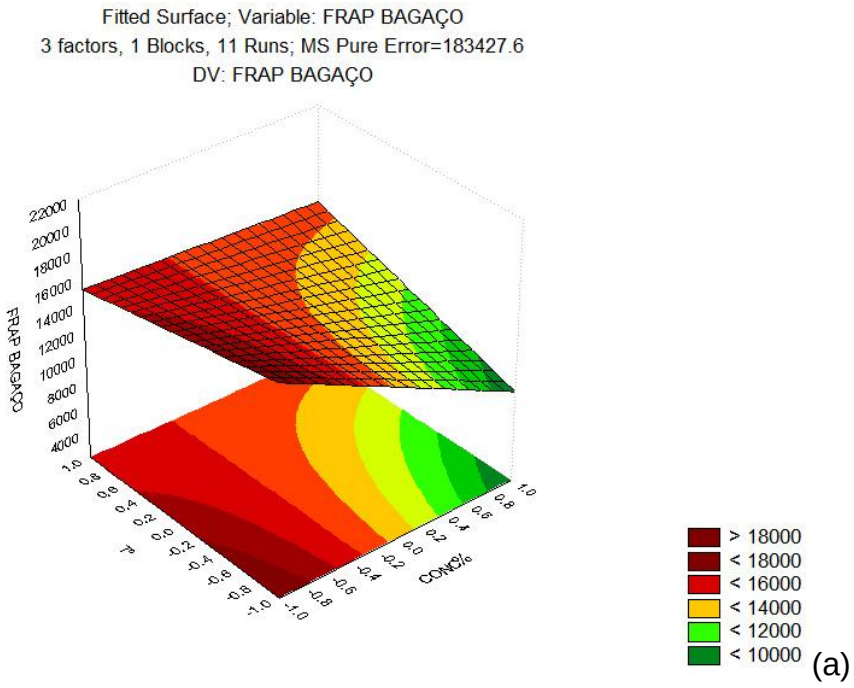
A Equação 2 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a AA pelo método de FRAP, em função das variáveis independentes (concentração, temperatura e tempo).

$$14242{,}60 - 2484{,}64.\,con + 638{,}48.\,T^{\underline{o}} - 3256{,}63.\,tempo + 2100{,}7.\,con.\,T^{\underline{o}} - 2275{,}15.\,con.\,temp \qquad (2)$$

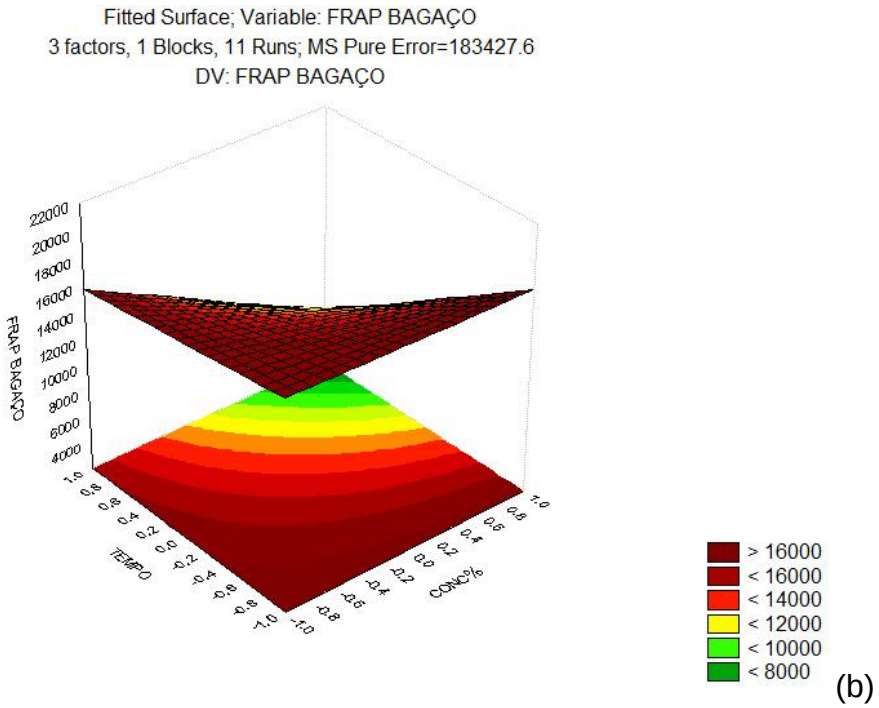
O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 8), em que se obteve um coeficiente de correlação de 0,84, indicando que o modelo foi significativo. Os valores de F_{calc} de 206,8 e F_{tab} de 4,46 demonstraram que o modelo foi preditivo, permitindo assim a construção das superfícies de resposta, apresentadas na Figura 7.

Tabela 8 - Resultados do Teste F

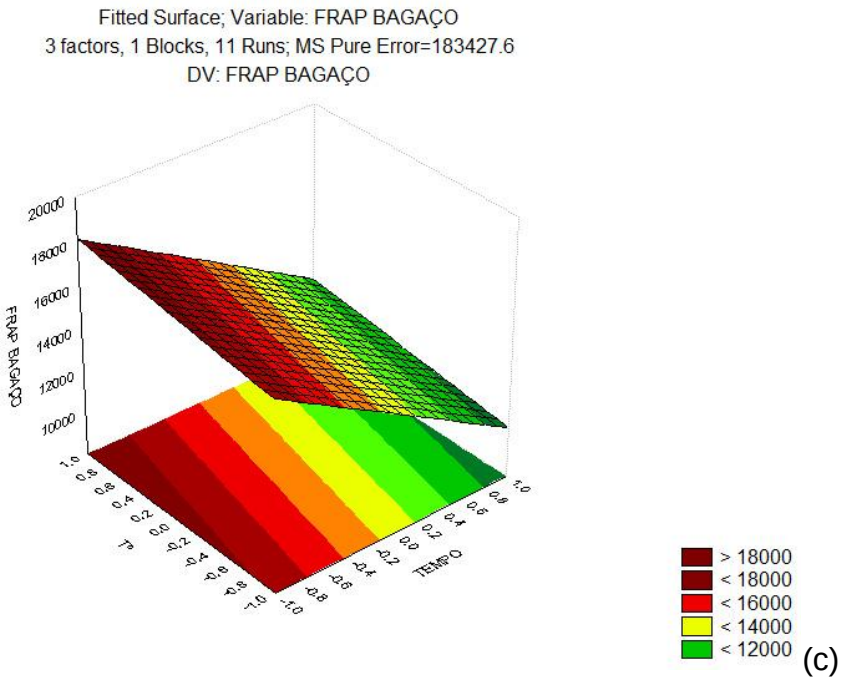
Fonte variação	GL	SQ	QM	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$
Regressão	8	303503623	37937952,9	206,8	4,46
Resíduo	2	366855	183427,5		
Total	10	303870478			



(a)



(b)



(c)

Figura 7 - Superfícies de resposta das variáveis TºC x concentração % (a), tempo (min) x concentração % (b) e TºC x tempo (min) (c).

5.2 Atividade antitumoral

5.2.1 Teste de viabilidade celular pelo método de MTT

O ensaio de MTT (sais de tetrazólio), consiste na avaliação da proliferação celular que quantifica a habilidade das células viáveis de converterem o sal amarelo de tetrazólio a cristais púrpuros de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase (SOLTAN-DALLAL et al., 2017; LADYMAN et al., 2016; MEHDI et al., 2017), este ensaio detecta células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

Neste estudo, os extratos fenólicos testados (EF 7 e EF 8) apresentaram atividade antitumoral frente a linhagem tumoral de glioma de rato (C6) nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas (Figura 8).

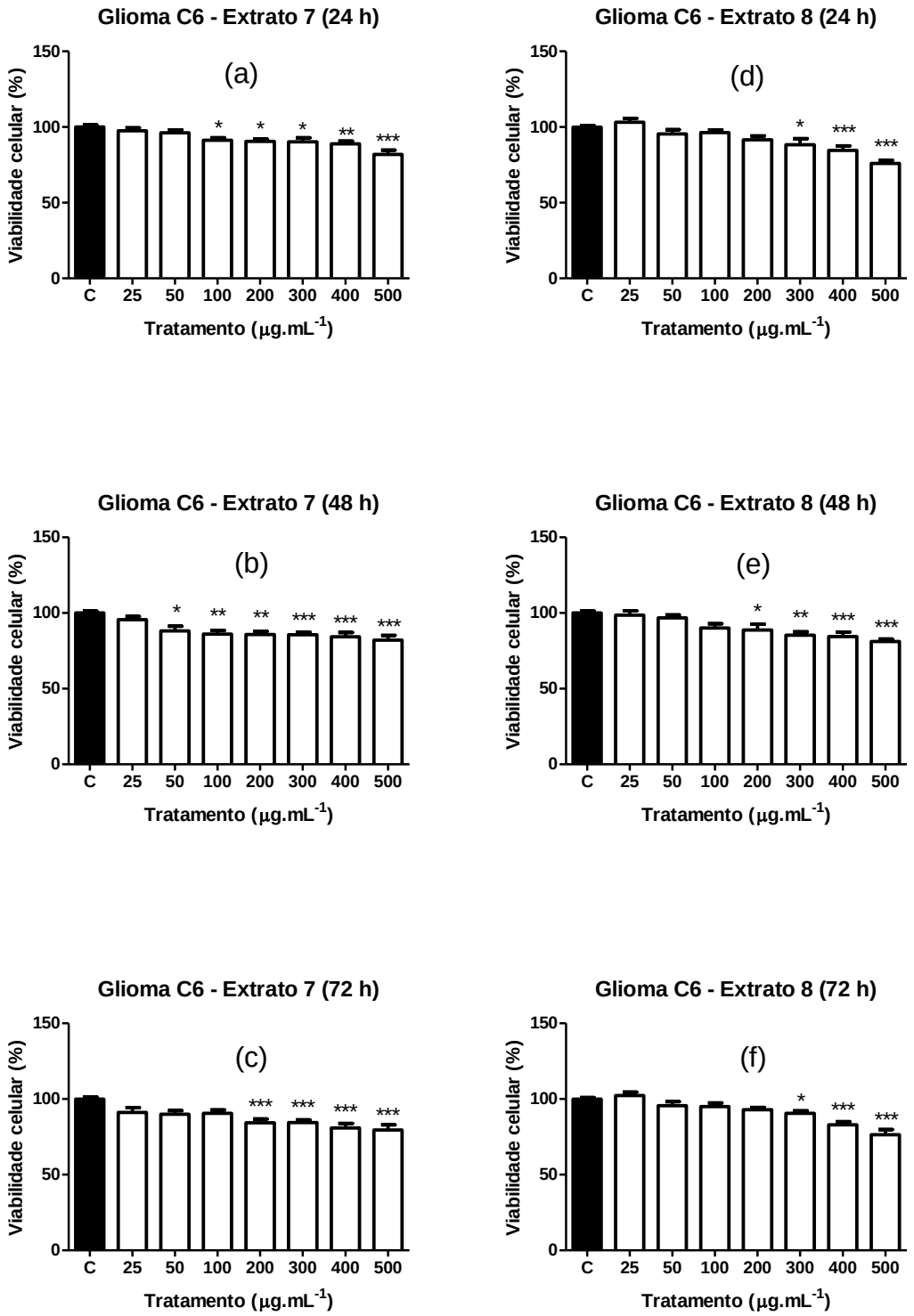


Figura 8 - Gráficos de viabilidade das células de linhagem de glioma de rato C6 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de bagaço de azeite. * Quanto maior o número de asteriscos, mais alta a significância estatística.

O extrato 7 apresentou atividade antitumoral nas concentrações de 100 até 500 µg.mL^{-1} no tempo de 24 horas (Figura 8a); em 48 horas estas

concentrações foram mantidas, sendo acrescida a concentração de 50 µg.mL^{-1} (Figura 8b). No período de 72 horas as concentrações do extrato 7 que apresentaram atividade antitumoral foram de 200 até 500 µg.mL^{-1}(Figura 8c). O extrato 8 apresentou atividade antitumoral nas concentrações de 300, 400 e 500 µg.mL^{-1} no período de 24 horas de incubação (Figura 8d); após 48 horas foram mantidas estas concentrações, com adição da 200 µg.mL^{-1} (Figura 8e). No período de 72 horas de incubação o extrato 8 apresentou atividade antitumoral nas concentrações de 300 a 500 µg.mL^{-1}(Figura 8f).

Martins et al. (2017) quando avaliaram a viabilidade de células Caco-2 (câncer de cólon) incubadas com bagaço de uva através de ensaio MTT, reportaram atividade antitumoral a partir da concentração de 250 µg.mL^{-1}, comportamento semelhante ao observado no presente estudo.

A terapia padrão para pacientes diagnosticados com glioma consiste na ressecação cirúrgica, terapia de radiação e quimioterapia (ZHANG et al., 2014). Com relação à remoção cirúrgica, os giomas exibem um elevado grau de invasão, infiltrando profundamente o tecido normal. A completa remoção cirúrgica deste tumor é muito difícil, o que gera uma alta incidência de sua recorrência (OKAZAKI et al., 2012). Existem poucas opções quimioterápicas para os gliomas, (PREUSSER et al. 2011), e muito pouco progresso tem sido feito no tratamento desse câncer em décadas (CHERRY et al., 2014). Um conjunto de moléculas promissoras para a terapia contra o câncer são os compostos fenólicos, os quais têm demonstrado capacidades diversas de indução de morte celular, inclusive em células tumorais (LI et al., 2010).

5.2.2 Teste de proliferação celular pelo método de Sulforodamina B (SRF)

No teste de SFR o corante utilizado é a aminoxantina de cor rosa brilhante, este possui dois grupos sulfônicos, que em condições ácidas ligam-se aos aminoácidos da proteína básica de células viáveis previamente fixadas com ácido tricloroacético. Este corante é usado como indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular, sendo este conteúdo proporcionalmente linear á densidade de células (KITAMURA et al., 2013).

Os extratos fenólicos testados (EF 7 e EF 8) apresentaram atividade antitumoral frente a linhagem tumoral de glioma de rato (C6) no teste de

viabilidade celular sulforodamina B, em tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas (Figura 9).

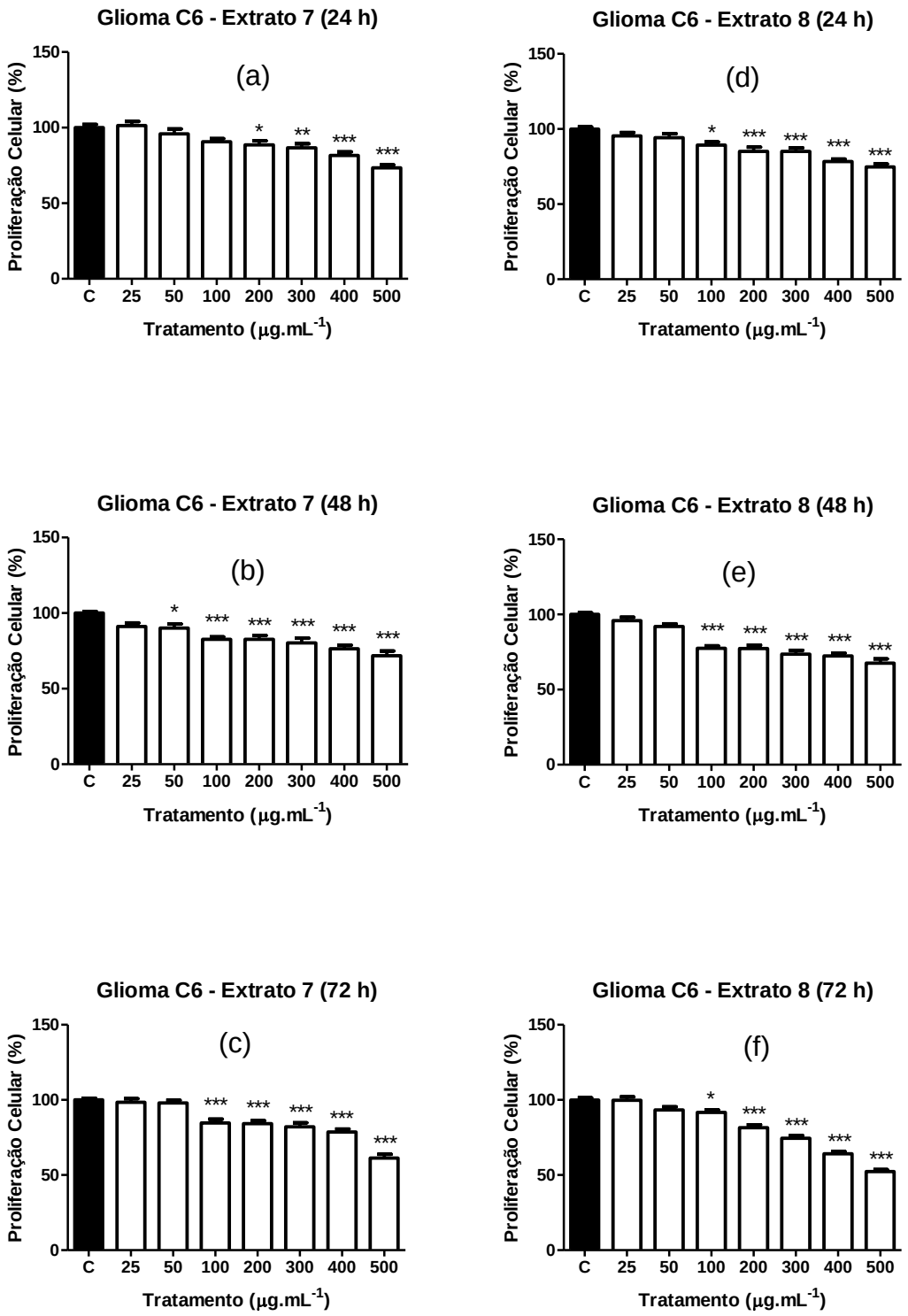


Figura 9 - Gráficos de viabilidade das células de linhagem de glioma de rato C6 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de bagaço de azeite.* Quanto maior o número de asteriscos, mais alta a significância estatística.

No período de incubação de 24 horas o extrato 7 apresentou atividade antitumoral frente as células de glioma de rato nas concentrações de 200 até 500 $\mu g.mL^{-1}$; no período de 48 horas as concentrações com atividade antitumoral foram de 50 até 500 $\mu g.mL^{-1}$; e em 72 horas de 100 a 500 $\mu g.mL^{-1}$. Para o extrato 8, no período de incubação de 24 horas, as concentrações com atividade antitumoral foram de 100 a 500 $\mu g.mL^{-1}$; e em 48 e 72 horas de incubação se mantiveram as mesmas concentrações com atividade antitumoral.

Até o momento não há registros na literatura científica de pesquisas referentes a ação antitumoral de compostos fenólicos presentes no bagaço da extração de azeite frente a linhagens tumorais de glioma (C6); no entanto, vários estudos investigaram o efeito antitumoral dos compostos fenólicos do azeite de oliva utilizando como modelo experimental a linhagem celular de leucemia promielocítica HL60. Della Ragione et al. (2000) demonstraram que o hidroxitirosol, em concentrações de 50 a 100 µM, induz ao bloqueio do ciclo celular, reduzindo o crescimento e a proliferação, e induzindo a apoptose em células HL60.

Além disso, Gichard et al. (2006) e mais tarde Hashim et al. (2008) demonstraram que o tratamento de células de adenocarcinoma de cólon humano com compostos fenólicos provenientes da oliva resultou na inibição de todos os processos carcinogênicos do cólon, como iniciação, promoção e metástase, desencadeando a morte celular por apoptose (morte celular programada) (DELLA RAGIONE et al., 2000; GUICHARD et al., 2006; HASHIM et al., 2008). Outros estudos demonstraram que os compostos fenólicos presentes no bagaço da extração de azeite de oliva exerceram efeitos protetores contra múltiplos tipos de câncer, tais como mama (BULOTTA et al., 2011; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2011; IBAÑEZ et al., 2012; TAAMALLI et al., 2012; RAMOS et al., 2013), hepatocarcinoma (TUTINO et al., 2012; BAOLEI et al., 2014), próstata (ACQUAVIVA et al., 2012) e pele (D'ANGELO et al., 2005).

Diferentes mecanismos podem ser responsáveis pelos efeitos citotóxicos resultantes dos tratamentos de linhagem celular C6 com os extratos fenólicos de bagaço da extração de azeite, incluindo a indução da morte celular por apoptose e/ou necrose, alteração no ciclo celular e perda de função chave nas

organelas. Devido às concentrações testadas no presente estudo terem exercido efeito citotóxico *in vitro*, para uma melhor compreensão do potencial e dos mecanismos da atividade antitumoral específica dos compostos fenólicos extraídos de bagaço da extração de azeite, tornam-se necessárias mais pesquisas, a fim de verificar o tipo de morte celular promovida por estes compostos, a possibilidade do efeito ser o mesmo *in vivo,* e de avaliar sua acessibilidade *in vivo* aos tecidos tumorais. Além disso, os demais aspectos devem ser investigados como a ação isolada e possível efeito sinérgico dos compostos fenólicos.

5.2.3 Ensaio de citotoxicidade em astrócitos

Os extratos 7 e 8 não apresentaram citotoxicidade frente a cultura de astrócitos (Figura 10), indicando que estes extratos apresentam ação seletiva, promovendo a morte somente em células tumorais. Ressalta-se que a maioria dos quimioterápicos disponíveis no mercado não atuam de forma seletiva, pois promovem a morte também de células sadias (KREISL, 2009; HOTTINGER, 2012).

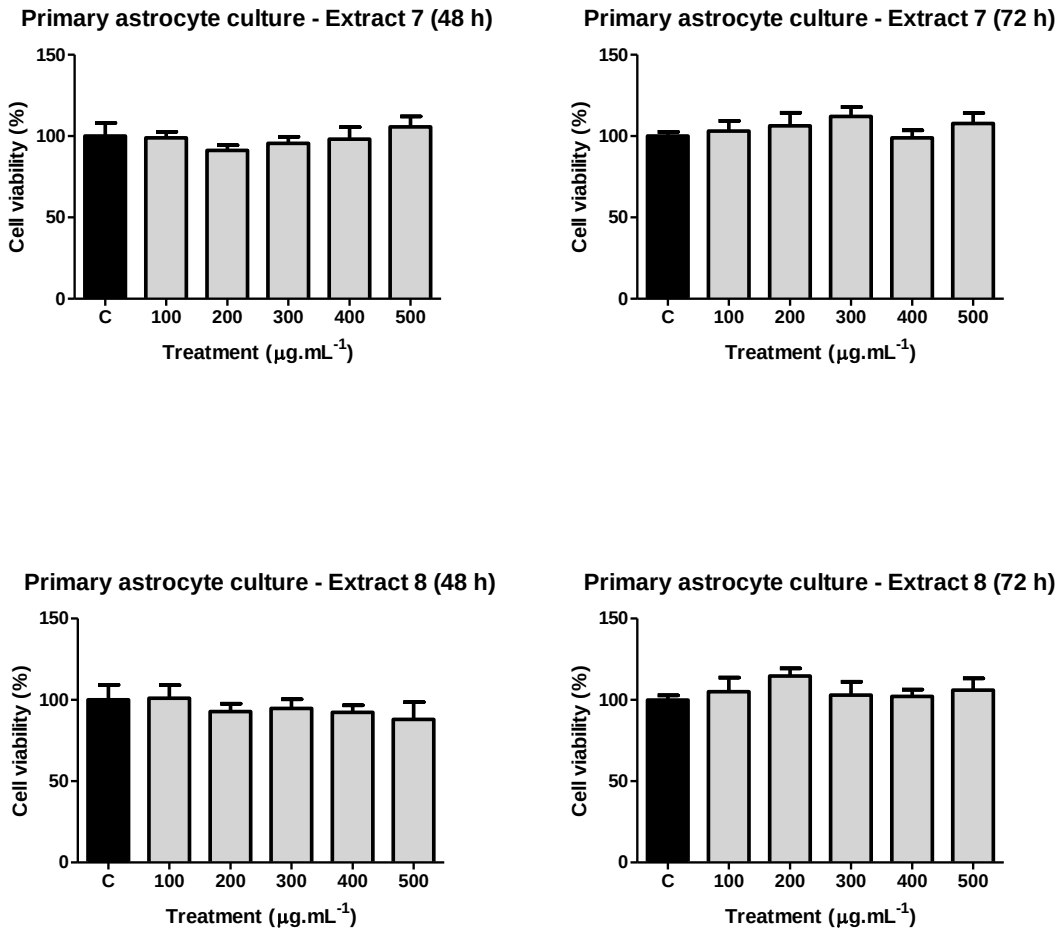


Figura 10 - Gráficos de viabilidade das células de linhagem de astrócitos expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de bagaço de azeite.

5.3 Atividade antibacteriana

5.3.1 Atividade antibacteriana por disco difusão

A avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana dos dois extratos fenólicos de bagaço de azeite (7 e 8), foi realizada através do método de disco difusão e mostrou que todas as bactérias testadas foram sensíveis a ambos os extratos (ocorreram halos de inibição), conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Zonas de inibição dos extratos 7 e 8

Micro-organismo	Zonas de inibição (mm)	
	Extrato 7 (100 mg/mL^{-1})	Extrato 8 (100 mg/mL^{-1})
E. coli	65	73
Salmonella spp.	70	74
S. aureus	58	63

*Resultados expressos como médias de três repetições.

Segundo Arora e Kaur (1999), halos menores que 0,7 cm (7mm) são considerados não-ativos, enquanto superiores a 1,2 cm (12 mm) apresentam efeito inibitório satisfatório, pode-se então considerar os halos encontrados como satisfatórios, considerando estes critérios, conforme resultado que pode ser visualizado na Tabela 9.

Em geral, as bactérias Gram-negativas apresentam uma maior resistência aos compostos antimicrobianos, fator atribuído a sua complexidade estrutural, representado por uma barreira resistente a penetração de compostos externos a célula, enzimas presentes em seu espaço periplasmático, conhecidas por inativarem determinados grupos antimicrobianos, e ainda, por mecanismos especializados, denominados de bombas de efluxo, que expulsam substâncias estranhas á célula bacteriana (DUFFY e POWER, 2001; KÖHLER, PECHÉRE e PLÉSIAT, 1999; NIKAIDO, 1989; SCHAECHTER et al., 2002; SARTORI et al., 2003; VAN BAMBEKE, MICHOT e TULKENS, 2003). No entanto esta resistência não foi verificada no presente estudo, em que as bactérias *E. coli* e *Salmonella* spp. apresentaram sensibilidade a ambos extratos testados (Tabela 9).

Obied et al. (2007) analisaram o efeito inibitório de extratos fenólicos de bagaço de azeite frente a *S. aureus* e *E. coli* por meio do teste de disco difusão, nas concentrações de 1,5; 2,5 e 5,0 mg/mL^{-1} e obtiveram zonas de inibição para *S. aureus* de 6,8; 7,8 e 9,2 mm, respectivamente. Para a bactéria *E. coli* as zonas de inibição foram de 0 (1,5 mg/mL^{-1}); 6,8 (2,5 mg/mL^{-1}) e 8,2 mm (5,0 mg/mL^{-1}).

A atividade antibacteriana dos compostos fenólicos é devida aos grupos hidroxila (-OH), os quais promovem ação inibitória das bactérias (LAI e ROY, 2004), pois esses podem interagir com a membrana de bactérias para romper

as estruturas da membrana e causar o vazamento de células componentes (XUE, DAVIDSON e ZHONG, 2013). Além disso, a presença dos grupos hidroxila promove a deslocalização de elétrons que, em seguida, atuam como trocadores de prótons e reduzem o gradiente de pH através da membrana citoplasmática das células bacterianas. Isso causará o colapso da força motora do próton e depleção do “pool” de ATP, levando a célula á morte (ULTEE, BENNIK e MOEZELAAR, 2002).

5.3.2 Atividade antibacteriana por determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

De acordo com a Tabela 10, o extrato 7 apresentou atividade bacteriostática frente a *E. coli* e *S. aureus*, com concentração inibitória mínima de 1mg/mL^{-1} para as duas bactérias.

Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos 7 e 8

Micro-organismo	CIM (mg/mL^{-1})	
	Extrato 7 (1 mg/mL^{-1})	Extrato 8 (10 mg/mL^{-1})
E. coli	+	+
Salmonella spp.	-	+
S. aureus	+	+

*+= Houve inibição do crescimento; -= Não houve inibição do crescimento.

Não foi observado efeito inibitório do extrato 7 frente a *Salmonella* spp. O extrato 8 apresentou atividade antibacteriana frente todas as bactérias testadas, no entanto a CIM (10mg/mL^{-1}) para as três bactérias foi superior, quando comparada ao extrato 7. Segundo Duarte et al. (2007) uma amostra para ser considerada de forte atividade antimicrobiana deve apresentar CIM de até 0,5 mg/mL^{-1}, para ser classificada como de atividade moderada entre 0,6 a 1,5 mg/mL^{-1} e para ser considerada como de fraca atividade antimicrobiana acima de 1,6 mg/mL^{-1}. Considerando estes critérios podemos classificar o extrato 7 como sendo de atividade moderada e o extrato 8 como de fraca atividade antimicrobiana. Este comportamento possivelmente é consequência da maior concentração de fenóis encontrada no extrato 7, comparada ao 8.

De acordo com Serra et al. (2008), a oleuropeína isolada, apresentou atividade antibacteriana no ensaio de microdiluição em caldo, frente a *E. coli*, em concentrações superiores (500 e 700 mg/mL^{-1}) as observadas no presente estudo. Belaqziz et al. (2017) testaram a atividade antibacteriana da oleuropeína isolada contra *S. aureus* pelo método de microdiluição em caldo e obtiveram concentração inibitória mínima de 62,5 mg/mL^{-1}. Tafesh et al. (2011) demonstraram que o hidroxitirosol isolado, composto majoritário no bagaço de azeite, inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* em um ensaio de microdiluição de caldo na concentração de 400 $\mu g/mL^{-1}$.

Nos ensaios de CBM os extratos não apresentaram atividade, demonstrando não ter ação bactericida, somente bacteriostática. A existência de potencial inibitório e inexistência de potencial bactericida segundo Rios e Recio (2005) pode, provavelmente, ser decorrente das concentrações das substâncias utilizadas que sofrem influência direta do tipo de cultivo da amostra e dos métodos de extração e do próprio método de análise, porém os resultados encontrados tem grande relevância considerando o caráter patogênico das bactérias avaliadas.

6 Conclusões

Através da metodologia de superfície de resposta foi possível observar que as duas condições que promoveram maior extração de compostos fenólicos foram obtidas nos ensaios com 40% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos, e na extração com 80% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos. As variáveis tempo e temperatura exerceram efeito positivo e significativo, enquanto que a concentração de solvente não exerceu efeito significativo. A maior atividade antioxidante foi encontrada no extrato obtido com 40% de metanol, 45 ºC e tempo de 180 minutos, sendo que as variáveis tempo e concentração de solvente exerceram efeito negativo e significativo, enquanto a variável temperatura não apresentou efeito significativo.

Os extratos obtidos com 40% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos, e com 80% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos, apresentaram atividade antitumoral frente a células de glioma (C6) em concentrações baixas nos dois testes realizados; além de atividade antibacteriana no teste de disco difusão frente as bactérias *E. coli*, *Salmonella spp* e *S. aureus*. No ensaio de CIM o extrato obtido com 40% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos apresentou atividade antibacteriana moderada e o extrato obtido com 80% de metanol, 70 ºC e tempo de 180 minutos exerceu fraca atividade antimicrobiana. Nos ensaios de CBM os extratos não apresentaram atividade, demonstrando não ter ação bactericida, somente bacteriostática.

Assim, foi possível concluir que o bagaço resultante da extração de azeite de oliva obtido pelo processo de extração de duas fases, apresenta potencial como fonte de compostos fenólicos, os quais conferem ação antioxidante, antibacteriana e antitumoral.

7 Perspectivas

A partir dos resultados das análises de atividade antitumoral *in vitro*, faz-se necessário uma nova etapa de estudos para uma melhor compreensão do potencial e dos mecanismos da atividade antitumoral específica dos compostos fenólicos extraídos de bagaço da extração de azeite de oliva, a fim de verificar o tipo de morte celular promovida por estes compostos, se este efeito é possível de ser alcançado *in vivo,* e para avaliar sua acessibilidade *in vivo* aos tecidos tumorais. Além disso, aspectos adicionais devem ser investigados, como a ação isolada e possível efeito sinérgico dos compostos fenólicos. Uma nova destinação para o bagaço oriundo da extração de azeite de oliva poderá resultar na produção de agentes antitumorais efetivos, agregando valor e reduzindo o impacto ambiental causado por estes resíduos.

No tocante a atividade antibacteriana, ressalta-se a necessidade de estudos que avaliem o comportamento dos extratos testados em sistemas alimentares, além do mecanismo de ação antibacteriana destes extratos, de forma a determinar os compostos com atividade antibacteriana e verificar se a atividade é exercida por compostos isolados ou de forma sinérgica.

8 Referências

ABU-LAFI, S.; AL-NATSHEH, M. S.; YAGHMOOR, R.; AL-RIMAWI, F. Enrichment of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater and In Vitro Evaluation of Their Antimicrobial Activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 2017.

ALBUQUERQUE, J.A.; GONZÁLEZ, J.; GARCIA, D.; CEGARRA, J. Measuring detoxification and maturity in compost made from “alperujo” the solid by-product of extracting olive oil by the two phase centrifugation system. **Chemosphere,** v.64, n.3, 470-477 p, 2006.

ALI, A., LIM, X. Y., CHONG, C. H., MAH, S. H., & CHUA, B. L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from Piper betle using response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology,** v. 89, p.681-688, 2017.

AL-MEHDI, A. B.; TOZAWA, K.; FISHER, A. B.; SHIENTAG, L.; LEE, A.; MUSCHEL, R. J. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. **Nature Medicine,** v. 6, p. 100-102, 2000.

ALÚDATT, M. H. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. **Food Chemistry,** v. 123, p. 117-122, 2010.

AMIOT, M.J.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J.J. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 34, p. 823–826, 1986.

ARAÚJO, M.; PIMENTEL, F. B.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. **Trends in Food Science & Technology,** v. 45, p. 200-211, 2015.

ARJONA, R.; GARCÍA, A.; OLLERO, P. The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry. **Journal of Food Engineering,** v. 41, p. 229-234, 1999.

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

AYOUB, N. M.; SIDDIQUE, A. B.; EBRAHIM, H. Y.; MOHYELDIN, M. M.; EL SAYED, K. A. The olive oil phenolic (-)-oleocanthal modulates estrogen receptor expression in luminal breast cancer in vitro and in vivo and synergizes with tamoxifen treatment. **European Journal of Pharmacology,** v. 810, p.100-111, 2017.

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

BARBARO, B.; TOIETTA, G.; MAGGIO, R.; ARCIELLO, M.; TAROCCHI, M.; GALLI, A.; BALSANO, C. Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 15, p.18508-18524, 2014.

BELAQZIZ, M.; TAN, S. P.; EL-ABBASSI, A.; KIAI, H., HAFIDI, A.; O'DONOVAN, O.; MCLOUGHLIN, P. Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of different olive processing wastewaters, **PloS one,** v. 12, p. 0182622, 2017.

BELWAL, T.; DHYANI, P.; BHATT, I.D.;RAWAL, R.S.; PANDE V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry,** v. 207, p. 115-124, 2016.

BERNINI, R.; MERENDINO, N.; ROMANI, A.; VELOTTI F. Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. **Current Medicinal Chemistry,** v. 20, p. 655-670, 2013.

BHATNAGAR, A.; KACZALA, F.; HOGLAND, W.; MARQUES, M.; PARASKEVA, C.; PAPADAKIS, V.; SILLANPÄÄ, M. Valorization of solid waste products from olive oil industry as potential adsorbents for water pollution

control—A review. **Environmental Science and Pollution Research,** v. 2, p. 268–298, 2014.

BOLAÑOS, J.F.; RODRÍGUEZ, G.; GOMEZ, E.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ, A.; HEREDIA, A.; RODRÍGUEZ, R. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: isolation of addedvalue compounds. **Journal of Agricultural Food and Chemistry,** n.52, 5849-5855 p, 2004.

BOSKOU, D. **Olive Oil: Minor Constituents and Health.** Boca Raton: CRC Press. 2008. 248p.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; SLIMANI, S.,; MADANI, K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of Eucalyptus globulus cultivated in Algeria. **Industrial crops and products,** v. 41, p. 85-89, 2013.

CANDIOTI, L. V., DE ZAN, M. M., CÁMARA, M. S., GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta,** v.124, 123-138, 2014.

CASA, R.; D'ANNIBALE, A.; PIERUCCETI, F.; STAZI, S.R.; GIOVANNOZZI SERMANNI, G.; CASCIO, B. L. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (Triticum durum Desf.) germinability. **Chemosphere,** v. 50, p. 959-966, 2003.

CAYUELA, J. A.; GARCÍA, J. F. (2017). Sorting olive oil based on alpha-tocopherol and total tocopherol content using near-infra-red spectroscopy (NIRS) analysis. **Journal of Food Engineering,** 202, 79-88.

CHAROENPRASERT, S.; MITCHELL, A. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 60, p.7081-7095, 2012.

CHEN, S., ZENG, Z., HU, N., BAI, B., WANG, H., SUO, Y. Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of Lycium ruthenicum Murr. fruit using response surface methodology. **Food Chemistry,** v. *242*, p. 1-8, 2018.

CHERRY, A. E.; STELLA, N. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenues. **Neuroscience,** v. 278, p. 222-236, 2014.

CHIANG, P. S.; LEE, D. J.; WHITELEY, C. G., HUANG, C. Y. Antioxidant phenolic compounds from Pinus morrisconicola using compressional-puffing pretreatment and water–ethanol extraction: Optimization of extraction parameters. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,** v. *70*, p. 7-14, 2017.

CLIFTON, P. M.; KEOGH, J. P. A systematic review of the effect of dietary saturated and polyunsaturated fat on heart disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,** v. 27, p. 1060-1080, 2017.

COVAS, M.I.; DE LA TORRE, R.; FITO, M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. **The British Journal of Nutrition,** v. 13, p. 19-28, 2015.

D'ANGELO, S.; INGROSSO, D.; MIGLIARDI, V.; SORRENTINO, A.; DONNARUMMA, G.; BARONI, A.; GALLETTI, P. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 38, p. 908-919, 2005.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova,** v. 28, p.118- 129, 2005

DE MARCO, E.; SAVARESE, M.; PADUANO, A.; SACCHI, R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. **Food Chemistry,** v. 104, p. 858-867, 2007.

DELLA RAGIONE, F.; CUCCIOLLA, V.; BORRIELLO, A.; DELLA PIETRA, V.; MANNA, C.; GALLETTI, P.; ZAPPIA, V. Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. **Biochemical and biophysical research communications,** v.268, p. 942-946, 2000.

DENT, M., DRAGOVIC-UZELAC, V., PENIC, M., BRNCIC, M., BOSILJKOV, T., LEVAJ, B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. **Food Technology and Biotechnology,** v. *51*, p. 84, 2013.

DEXTER, D.T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 62, p. 132-144. 2013.

DUARTE, M. C. T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, p. 139-143, 2006.

DUFFY,C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plants extracts. **International Jounal of Antimicrobial,** v.17, n. 8, p. 527-529, 2001.

ERGÖNÜL, G. P; SÁNCHEZ, P. Evaluation of polycycic aromatic hydrocarbons content in different types of olive an olive pomace oils produced in Turkey and Spain. **European Journal of Lipid Science and technology,** v. 115, 1078-1084 p, 2013.

ESCRICH, E.; MORAL, R.; GRAU, L.; COSTA, I.; SOLANAS, M. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. **Molecular Nutrition & Food Research,** 51, 1279 – 1292, 2007.

ESPADA-BELLIDO, E.; FERREIRO GONZALEZ, M. .; CARRERA, C. .; PALMA, M. ; BARROSO, C.G.; BARBERO, G.F. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry,** v. 219, p. 23-32, 2017.

FABIANI, R. Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies. **Food Function,** v. 12, p. 4145-4159, 2016.

FABIANI, R.; ROSIGNOLI, P.; DE BARTOLOMEO, A.; FUCCELLI, R.; SERVILI, M.; MONTEDORO, G.F.; MOROZZI, G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. **Journal of Nutrition,** v. 138, p. 1411–6, 2008.

FARAG, R. S.; EL-BAROTY, G. S.; BASUNY, A. M. Safety evaluation of olive phenolic compounds as natural antioxidants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition,** v. 54, p. 159–174, 2003.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. O que realmente significa o valor-p ? **Jornal Brasileiro de Pneumologia.,** v. 41, p. 3713, 2015.

FIORENTINO, A.; GENTILI, A.; ISIDORI, M.; MONACO, P.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A.; TEMUSSI, F. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecularweight phenol components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, p. 1005-1009, 2003.

FLEMING, H. P.; WALTER, W. M..; ETCHELLS, J. L. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. **Applied microbiology,** v. 26, p. 777-782, 1973

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer,** v. 5, p. 526–542, 2005.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, R.; BELAJ, A.; ROMERO-SEGURA, C.; SANZ, C.; PÉREZ, A. G. Exploration of genetic resources to improve the functional quality of virgin olive oil. **Journal of Functional Foods,** v. 38, p. 1-8, 2017.

GHITESCU, R.E.; VOLF, I. .; CARAUSU, C. .; BUHLMANN, A.M. .; GILCA, I.A. .; POPA, V.I. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics Sonochemistry,** v.22, p. 535-541, 2015.

GILL, C. I., BOYD, A., MCDERMOTT, E., MCCANN, M., SERVILI, M., SELVAGGINI, R., ROWLAND, I. Potential anti-cancer effects of virgin olive oil

phenols on colorectal carcinogenesis models in vitro. **International Journal of Cancer,** v. 117, p. 1-7, 2005.

GOLDSMITH, C. D., VUONG, Q. V., STATHOPOULOS, C. E., ROACH, P. D., SCARLETT, C. J. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. **LWT-Food Science and Technology,** v. 89, p. 284-290, 2018.

GONZALEZ-CORREA, J.A.; NAVAS, M.D.; LOPEZ-VILLODRES, J.A.; TRUJILLO, M.; ESPARTERO, J.L.; DE LA CRUZ, J.P. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. **Neuroscience Letters,** v. 446, p. 143- 146, 2008.

GONZALEZ-SANTIAGO, M.; FONOLLA, J.; LOPEZ-HUERTAS, E. Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol a natural antioxidant from olive oil and evidence for its transient association with low-density lipoproteins. **Pharmacological Research,** v. 61, p. 364-370, 2010.

GOWER, R. The new Manners and Customs of Bible Times. 2 ª ed. Chicago. **Moody Press,** 350 p, 2012.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J.L.; RAMIREZ-TORTOSA, C., CAMACHO-CORENCIA, P.; SANCHEZ- ROVIRA, P.; VERA-RAMIREZ, L.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C. Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours**. Molecular Nutrition & Food Research,** v. 55, p. 117-126, 2010.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, C.; CAMACHO-CORENCIA, P.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; VERA-RAMIREZ, L.; RAMIREZ-TORTOSA, M. Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours. **Molecular nutrition & food research,** p. 55, 2011.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; EL-AZEM, N., PAMPLONA, R.; RAMIREZ-TORTOSA, C.; PULIDO-MORAN, M.; VERA-RAMIREZ, L.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C. Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial

dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. **Biochemical Pharmacology,** v. 90, p. 25-33, 2014.

GUICHARD, C.; PEDRUZZI, E.; FAY, M.; MARIE, J. C.; BRAUT-BOUCHER, F.; DANIEL, F.; LIZARD, G. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. **Carcinogenesis,** v. 27, p. 1812-1827, 2006.

HADJ-TAIEB, N.; GRATI, N.; AYADI, M.; ATTIA, I.; BENSALEM, H.; GARGOURI, A. Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisian olive oil using enzymatic formulations during malaxation. **Biochemical Engineering Journal,** v. *62*, p. 79-85, 2012.

HAGIWARA, K.; GOTO, T.; ARAKI, M.; MIYAZAKI, H.; HAGIWARA, H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. **European Journal of Pharmacology,** v. 662, p. 78–84, 2011.

HAN, Q.; WU, Z.; HUANG, B.; SUN, L.; DING, C.; YUAN, S.; LIU, J. Extraction, antioxidant and antibacterial activities of *Broussonetia papyrifera* fruits polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 92, p. 116-124, 2016.

HASHIM, Y. Z. Y.; ROWLAND, I. R.; MCGLYNN, H.; SERVILI, M.; SELVAGGINI, R.; TATICCHI, A.; GILL, C. I. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. **International Journal of Cancer,** v. 122, p. 495-500, 2008.

HE, B.; ZHANG, L.L.; YUE, X.Y. ; LIANG, J. .; JIANG, J. .; GAO, X.L. .; YUE, P.X..Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry,** v.204, p. 70-76, 2016.

INNANGI, M.; NIRO, E.; D'ASCOLI, R.; DANISE, T.; PROIETTI, P.; NASINI, L.; REGNI, L.; CASTALDI, S.; FIORETTO, A. Effects of olive pomace amendment on soil enzyme activities. **Applied Soil Ecology,** v.119, p.242-249, 2017.

JOVANOVIĆ, A. A., ĐORĐEVIĆ, V. B., ZDUNIĆ, G. M., PLJEVLJAKUŠIĆ, D. S., ŠAVIKIN, K. P., GOĐEVAC, D. M., BUGARSKI, B. M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques**. Separation and Purification Technology,** v. 179, p. 369-380, 2017.

KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. **Food Chemistry,** v.119, p. 343-348, 2010.

KITAMURA, M.; MURAKAMI, K.; YAMADA, K.; KAWAI, K.; KUNISHIMA, M. Binding of sulforhodamine B to human serum albumin: A spectroscopic study. **Dyes and Pigments,** v. 99, p.588-593, 2013.

KÖHLER, T.; PECHÉRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Science,** v. 56, n.14, p. 771-778, 1999.

LADYMAN, K. M.; WALTON, J. G. A.; LILIENKAMPF, A.; BRADLEY, M. Fluorescent Formazans and Tetrazolium Salts - Towards Fluorescent Cytotoxicity Assays. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening,** v. 19, p.384-391, 2016.

LAFKA, T. I.; LAZOU, A. E.; SINANOGLOU, V. J.; LAZOS, E. S. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. **Food Chemistry,** v. 125, p. 92-98, 2011.

LAI, P. K.; ROY, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. **Current Medicinal Chemistry,** v. 11, p. 1451-1460, 2004.

LEOUIFOUDI, I.; HARNAFI, H.; ZYAD, A. Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. **Advances in Pharmacological Sciences,** v. 2015, p.11, 2015.

LI, C. Y.; XU, H. L.; LIU, B.; BAO, J. K. Concanavalin A, from an Old Protein to Novel Candidate Anti-Neoplastic Drug. **Current Molecular Pharmacology,** v. 3, p. 123-128, 2010.

LIU, Z., DANG, J., WANG, Q., YU, M., JIANG, L., MEI, L.TAO, Y. Optimization of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* fruit using RSM and its anti-oxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 61, p. 127-134, 2013.

LÓPEZ DE LAS HAZAS, M.C.; PIÑOL, C., MACIÀ, A.; MOTILVA, M.J. Hydroxytyrosol and the colonic metabolites derived from virgin olive oil intake induce cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 19, p.6467-6476, 2017.

LUKIĆ, I.; ŽANETIĆ, M.; ŠPIKA, M. J.; LUKIĆ, M.; KOPRIVNJAK, O.; BUBOLA, K. B. Complex interactive effects of ripening degree, malaxation duration and temperature on Oblica cv. virgin olive oil phenols, volatiles and sensory quality. **Food Chemistry,** v. 232, p. 610-620, 2017.

MAALEJ, A.; BOUALLAGUI, Z.; HADRICH, F.; ISODA, H.; SAYADI, S. Assessment of *Olea europaea* L. fruit extracts: Phytochemical characterization and anticancer pathway investigation. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v. 97, p.179-186, 2017.

MARTINS, I. M.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; ROBERTO, B. S.; CHEN, Q.; BLUMBERG, J. B.; CHEN, C. Y. O. Tannase enhances the anti-inflammatory effect of grape pomace in Caco-2 cells treated with IL-1β. **Journal of Functional Foods,** v. 29, p. 69-76, 2017.

MEDINA, E., DE CASTRO, A.; ROMERO, C.; BRENES, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 54, p. 4954-4961, 2006.

MEDINA-MARTÍNEZ, M. S.; TRUCHADO, P.; CASTRO-IBÁÑEZ, I.; ALLENDE, A. Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: a current controversy. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** v. 80, p. 801-810, 2016.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. **Journal of Cleaner Production,** v. 65, p.28–41, 2014.

MOHAGHEGHI, F.; BIGDELI, M. R.; RASOULIAN, B.; HASHEMI, P.; POUR, M. R. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood–brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. **Phytomedicine,** v. 18, p. 170-175, 2011.

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

MUKERJEE, S. **O imperador de todos os males – Uma biografia do câncer.** São Paulo: Companhia da Letras, 2012, 634 p.

MUSTAFA, A., TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta,** v. 703, p. 8-18, 2011.

NAZIRI, E.; NENADIS, N.; MANTZOURIDOU, F. T.; TSIMIDOU, M. Z. Valorization of the major agrifood industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications. **Food Research International,** v. 65, p. 350–358, 2014.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents Chemoteraphy,** v.33, n.8, p. 1831-1836, 1989.

OBIED, H. K.; BEDGOOD JR, D. R.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. **Food and Chemical Toxicology,** v. 45, p. 1238-1248, 2007.

OKAZAKI, T.; KAGEJI, T.; KUWAYAMA, K.; KITAZATO, K. T.; MURE, H.; HARA, K.; MORIGAKI, R.; MIZOBUCHI, Y.; MATSUZAKI, K.; NAGAHIRO, D. Upregulation of endogenous PML induced by a combination of interferon-beta and temozolomide enhances p73/YAP-mediated apoptosis in glioblastoma. **Cancer Letters,** v. 323, p. 199-207, 2012.

OMAR, S. H. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. **Saudi Pharmaceutical Journal,** v. 18, p. 111–121, 2010.

PAIXÃO, SM.; MENDONÇA, E.; PICADO, A.; ANSELMO, A. M. Acute toxicity evaluation of olive oil mill wastewaters: a comparative study of three aquatic organisms". **Environmental Toxicology,** v. 14, p. 263-269, 1999.

PEREZ-BONILLA, M.; SALIDO, S.; VAN BEEK, T.A.; ALTAREJOS, J. Radical-scavenging compounds from olive tree (*Olea europaea* L.) wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 62, p.144-151, 2014.

PRASAD, K. N., HASSAN, F. A., YANG, B., KONG, K. W., RAMANAN, R. N., AZLAN, A., ISMAIL, A. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised Mangifera pajang Kosterm peels. **Food Chemistry,** v. 128, p. 1121-1127, 2011.

PREUSSER, M.; DE RIBAUPIERRE, S.; WOHRER, A.; ERRIDGE, S. C.; HEGI, M.; WELLER, M.; STUPP, R. Current concepts and management of glioblastoma. **Annals of Neurology,** v. 70, p. 9-21, 2011.

RAFEHI, H.; SMITH, A.J.; BALCERCZYK, A.; ZIEMANN, M.; LOVERIDGE, S.J.; KARAGIANNIS,T.C. Investigation into the biological properties of the olive polyphenol hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq analysis. **Genes & Nutrition,** v. 7, p. 343-355, 2012.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Exploitation of food industry waste for high-value products. **Trends in Biotechnology,** v. 34, p. 58–69, 2016.

RÍOS-MARCO, P.; RÍOS, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M.; CARRASCO, M. P.; MARCO, C. Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines. **Biochemical Pharmacology,** v. 96, p. 10-19, 2015.

RODRIGUEZ-MORATO, J.; XICOTA, L.; FITO, M.; FARRE, M.; DIERSSEN, M; DE LA TORRE, R. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. **Molecules (Basel Switzerland),** v. 20, p.4655-4680, 2015.

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

RYAN, D.; ANTOLOVICH, M.; HERLT, T.; PRENZLER, P.D.; LAVEE, S.; ROBARDS, K. Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 50, p. 6716–6724, 2002.

SAHIN, S.; SAMLI, R. Otimização do extrato de folha de oliveira obtido por extração ultra-sonográfica com metodologia de superfície de resposta. **Ultrasonis Sonochemestry,** v. 20, p. 595-602, 2013.

SANTOS, L.; RAMOS, A. **A cultura da Oliveira. Castelo Branco.** Serviços gráficos da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco. 92 p, 1987.

SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J. B.; CRUZ, A. B.; BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACHINO, S. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from Wedelia paludosa (*Acmela brasilium*) (ASTERACEAE). **Pharmazie,** v. 58, n. 8, p. 567-569, 2003.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas**. 3.ed. Rio e Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 642p.

SCIOLI, C.; VOLLARO L. The use of Yarrowia lipolytica to reduce pollution in olive mill wastewaters. **Water Research,** v. 31, p. 2520-2524, 1997.

SERRA, A. T.; MATIAS, A. A.; NUNES, A. V.; LEITÃO, M. C.; BRITO, D.; BRONZE, R.; Duarte, C. M. In vitro evaluation of olive-and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. **Innovative Food Science & Emerging Technologies,** v. 9, p. 311-319, 2008.

SHARMA, A.; DEL CARMEN FLORES-VALLEJO, R.; CARDOSO-TAKETA, A.; VILLARREAL, M. L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology,** 208, 264-329, 2017.

SHEN, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, R.; TU, X.; GONG, X. Ursolic acid induces autophagy in U87MG cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. **Chemico-Biological Interactions,** v. 218, p. 28-41, 2014.

SIRIANNI, R.; CHIMENTO, A.; DE LUCA, A.; CASABURI, I.; RIZZA, P.; ONOFRIO, A.; PEZZI, V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation**. Molecular Nutrition & Food Research,** v. 54, p. 833-840, 2010.

SOLTAN-DALLAL, M. M.; VALIDI, M.; DOURAGHI, M.; FALLAH-MEHRABADI, J. ; LORMOHAMMADI, L. Evaluation the cytotoxic effect of cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca* isolates on the HEp-2 cell line by MTT assay. **Microbial Pathogenesis,** v. 113, p.416-421, 2017.

SUN, Y.; WENGIN, X.; WENGIN, Z.; QIUHUI, H. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from Ilex kudingcha C.J. Tseng by using response surface methodology. **Separation and Purification Technology,** v. 78, p.311-320, 2011.

SUSALIT, E.; AGUS, N.; EFFENDI, I.; TJANDRAWINATA, R. R.; NOFIARNY, D.; PERRINJAQUET-MOCCETTI, T.; VERBRUGGEN, M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. **Phytomedicine,** v. 18, p. 251-258, 2011.

TAFESH, A.; NAJAMI, N.; JADOUN, J.; HALAHLIH, F.; RIEPL, H.; AZAIZEH, H. Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 2011.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in a model food system. **Journal of Food Protection,** v. 57, p. 120-124, 1994.

TUTINO, V.; CARUSO, M. G.; MESSA, C.; PERRI, E.; NOTARNICOLA, M. Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines. **Anticancer Research,** v. 32, p. 5371-5377, 2012.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 68, p. 1561-1568, 2002.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; TULKENS, P. M. Antibiotics efflux pumps in eukariotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacocinetcs, pharmacodynamics and toxicodynamics. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy,** v.51, n.14, p. 1077-1077, 2003.

VERA, R.; AGUILAR, C.; LIRA, R.; TORO, P.; BARRALES, L.; PEÑA, I.; BRIONES, I. Feeding dry olive cake modifies subcutaneous fat composition in lambs, noting cake resistance to degradation and peroxidation. **Chilean journal of Agricultural Research,** v. 69, p. 548-559, 2009.

VISIOLI, F. Olive oil phenolics: where do we stand? Where should we go? **Journal of the Science and Food Agriculture,** v. 92, p. 2017-2019, 2012.

VITOLO, S.; PETARCA, L.; BRESCI, B. Treatment of olive oil industry wastes. **Bioresource Technology,** v. 67, p. 129-137, 1999.

XUE, J.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 61, p. 12720-12726, 2013.

YANIK, D. K. Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace. **LWT - Food Science and Technology,** v. 77, p. 45-51, 2017.

YINGNGAM. B.; SUPAKA, N.; RUNGSEEVIJITPRAPA, W. Optimization of process parameters for phenolics extraction of *Cratoxylum formosum* ssp. formosum leaves by response surface methodology**. Journal of Food Science and Technology,** v. 52, p.129-140, 2015.

YUAN, B., LU, M., ESKRIDGE, K. M., ISOM, L. D., HANNA, M. A. Extraction, identification, and quantification of antioxidant phenolics from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells. **Food Chemistry,** v. 244, 7-15, 2018.

ZBAKHA, H.; EL ABBASSI, A. Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review. **Journal of Functional F oods,** v. 4, p.53-65, 2012.

ZHANG, X.; GUO, M.; SHEN, L.; HU, S. Combination of photodynamic therapy and temozolomide on glioma in a rat C6 glioma model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy,** v. 11, p. 603-612, 2014

ZORIC, N.; HORVAT, I.; KOPJAR, N.; VUCEMILOVIC, A.; KREMER, D.; TOMIC, S.; KOSALEC, I. Hydroxytyrosol expresses antifungal activity in vitro. **Current Drug Targets,** v. 14, p. 992-998. 2013.

ZUORRO, A.; MAFFEI, G;. LAVECCHIA, R. Efeito do tipo de solvente e condições de extração na recuperação de compostos fenólicos de resíduos de alcachofra. **Chem. Eng. Trans. ,** v. 39, p. 463-468, 2014.

ZWANE, R.E.; PARKER, A.; KUDANGA, T.; DAVIDS, L.M.; BURTON, S.G. Novel biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 60, p. 11509-11517, 2012.