



LUCIANA RESENDE CARDOSO JÚLIO

**TRATAMENTO, CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA E ESTUDO *IN VIVO* DO BAGAÇO DE
AZEITONA RESULTANTE DA EXTRAÇÃO DO
AZEITE DE OLIVA**

LAVRAS - MG

2015

LUCIANA RESENDE CARDOSO JÚLIO

**TRATAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO *IN VIVO*
DO BAGAÇO DE AZEITONA RESULTANTE DA EXTRAÇÃO DO
AZEITE DE OLIVA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Maria de Fátima Pícolo Barcelos

LAVRAS - MG

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio (a) autor (a)**

Júlio, Luciana Resende Cardoso.

Tratamento, caracterização química e estudo *In vivo* do bagaço de azeitona resultante da extração do azeite de oliva / Luciana Resende Cardoso Júlio. – Lavras : UFLA, 2014.

144 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador(a): Maria de Fátima Píccolo Barcelos.

Bibliografia.

1. Resíduo. 2. Farinha. 3. Polifenóis. 4. Ensaio biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LUCIANA RESENDE CARDOSO JÚLIO

**TRATAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO *IN VIVO*
DO BAGAÇO DE AZEITONA RESULTANTE DA EXTRAÇÃO DO
AZEITE DE OLIVA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 9 de dezembro de 2014.

Dr. Wilson César de Abreu	UFLA
Dr. Adelson Francisco de Oliveira	EPAMIG
Dra. Martha Elisa Ferreira de Almeida	UFV
Dra. Rosalina Maragon Lima Medeiros	Empresa Medinovação

Dra. Maria de Fátima Píccolo Barcelos

Orientadora

LAVRAS - MG

2014

Dedico este trabalho a todos que contribuíram para a sua realização e, em especial, aos meus amores, Betinho e Maria Teresa.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Iniciar o doutorado foi uma decisão em um momento muito difícil, mas não sabia que Deus, em sua infinita bondade, estava encontrando o ambiente propício para a realização de um grande sonho. Por isso, inicio os meus agradecimentos àquele mentor de tudo, meu Deus, meu tudo!!! Nem tenho palavras para agradecer tamanha dádiva!

Ao meu grande amor e companheiro de todas as horas, Betinho. Obrigada por estar do meu lado, permitindo que eu vá além. Com você, consigo enfrentar os grandes desafios!

Ao meu supremo amor, razão de tudo, Maria Teresa, minha filha. Como sonhei em, um dia, poder dizer essas palavras. A sua existência me faz melhor a cada dia.

À minha querida orientadora, Fátima, que me acolheu em um momento difícil, em que precisava realmente adquirir forças para iniciar o doutorado, acreditou na minha capacidade e me impulsionou durante o percurso. E, o mais importante, orou por mim e vibrou com a minha vitória pessoal. Serei eternamente grata a você, Fátima.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade de desfrutar de ensino de qualidade.

A Tina, Denise e Heloísa, não somente pelas ajudas nas análises, mas pelas sábias palavras que me impulsionavam a cada dia, na busca do meu sonho. Neste time também quero agradecer as servidoras técnico-administrativas Lucilene, Rhaimá e Adriana.

Aos meus pais e irmãos queridos, que vibram sempre com minhas vitórias.

Ao meu tio Eduardo, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, pelo carinho e colaboração na análise cromatográfica.

Aos meus amigos e colaboradores, professor Wilson de Abreu e professor Michel Cardoso, pelos conselhos e amizade de sempre!

À Rosalina, pelo incentivo e grande disponibilidade.

Ao professor Eduardo Valério de Barros Vilas Boas que muito gentilmente contribuiu para a realização do meu projeto de pesquisa.

Ao sempre prestativo Renato Leal, obrigada pela grande ajuda!

Aos amigos que conquistei na UFLA, Cristiane, Juliana, Elizandra, Ívina e Túlio. Foi muito bom conhecer e conviver com vocês!

Aos amigos de travessia, Formiga-Lavras, Tânia, Lília e Fernando. As nossas idas e vindas, juntos em oração, me capacitavam, a cada dia, a finalizar esta travessia. Obrigada!

À professora e amiga Martha Elisa que não somente abriu as portas do seu laboratório, mas me acolheu em sua casa, me apoiou e se dedicou ao meu experimento. Sou eternamente grata!

Ao Antônio, marido da Martha, que também sempre se mostrou disponível em me ajudar.

À aluna de Ciência dos Alimentos, Juliana, pela enorme dedicação e carinho com que me ajudou no experimento *in vivo*.

Às alunas da Nutrição, Bruna e Cíntia, obrigada pela grande ajuda.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) de Lavras, mais especificamente à Fazenda Experimental de Maria da Fé, MG, pela grande contribuição ao gentilmente conceder as amostras para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de recursos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por ter concedido os animais experimentais (ratos) e ao Campus de Rio Paranaíba, pela utilização do Laboratório de Nutrição Experimental.

Enfim, a todos os envolvidos neste lindo processo, muito obrigada!

*O vento balançou meu barco em alto mar, o medo me cercou e quis me afogar,
Mas então eu clamei ao filho de Davi, Ele me escutou por isso estou aqui
O vento Ele acalmou, o medo repreendeu,
Quando Ele ordenou o mar obedeceu*

*Não temo mais o mar, pois firme está minha fé
No meu barquinho está Jesus de Nazaré
Se o medo me cercar ou se o vento soprar
Seu nome eu clamarei
Ele me guardará*

Gisele Cristina

RESUMO

Com o objetivo de viabilizar o uso, na alimentação humana, do bagaço de azeitonas resultante da extração do azeite de oliva por centrifugação em sistema de duas fases foram conduzidos dois experimentos. Com o primeiro experimento objetivou-se testar diferentes tratamentos (água em temperatura ambiente, água aquecida, solução salina a 1%, solução salina a 2% e secagem úmida a 55 °C) e obter a farinha do bagaço para cada tratamento, incluindo da sua forma bruta. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e três repetições e as análises químicas compreenderam a composição centesimal com fibra alimentar, minerais, perfil de ácidos graxos, ácidos orgânicos, fenólicos totais e atividade antioxidante total *in vitro* pelos métodos, β -caroteno/ácido linoleico, DPPH e ABTS. Os resultados indicaram que os tratamentos aplicados não alteraram de forma significativa a composição centesimal das farinhas, e todas apresentaram elevado conteúdo de fibra alimentar. Teores elevados de minerais, sobretudo o potássio, foram encontrados nas farinhas, mas o uso de soluções aquosas promoveu uma redução nesses compostos. Destaque é dado à baixa toxicidade em relação à concentração do mineral chumbo. Em todas as farinhas, o ácido graxo oleico apresentou-se em teores elevados; já o ácido orgânico oxálico foi encontrado em maior concentração nas farinhas obtidas com o resíduo tratado. Os tratamentos propiciaram uma queda significativa nos teores dos fenólicos totais e da capacidade antioxidante. No segundo experimento, objetivou-se avaliar o efeito da farinha obtida do bagaço de azeitonas tratado obtido da extração do azeite de oliva introduzida na dieta de ratos Wistar, sobretudo no controle lipídêmico desses animais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e sete repetições. A composição centesimal das farinhas obtidas do resíduo bruto e tratado foi efetuada para ajustes dos macronutrientes no padrão da AIN – 93M. No decorrer do experimento, foram analisados o consumo alimentar e o desenvolvimento ponderal dos ratos. Ao final, as fezes foram coletadas para análises do teor de lipídeos e fenólicos totais, para a obtenção do coeficiente da digestibilidade aparente desses compostos. Após o sacrifício dos animais, realizaram-se a coleta do plasma sanguíneo e a secção do fígado, para análise do lipidograma, transaminases, peso do fígado e histologia hepática, respectivamente. Os resultados indicaram que os ratos alimentados com a farinha do bagaço de azeitonas não tiveram alterações significativas no consumo alimentar e atingiram um desenvolvimento ponderal normal conforme a dieta padrão. As farinhas utilizadas nas dietas apresentaram boa digestibilidade lipídica e fenólica, porém, o aumento do consumo de fenólicos promoveu maior perda fecal desses compostos, o que pode ter refletido em fezes com coloração mais

escuras. Os ratos submetidos às dietas indutoras da elevação do colesterol apresentaram um aumento da glicemia capilar caudal, porém, não diferindo estatisticamente do controle, elevado teor de CT, LDL-c e redução da HDL-c, TAG e VLDL. Pelas análises das transaminases, somente foi evidenciado nível elevado quanto à ALT para o grupo que recebeu a dieta indutora da elevação do colesterol com introdução de 5% da farinha do bagaço de azeitonas. Evidenciou-se que os fenólicos contidos no bagaço de azeitonas, apesar de terem apresentado bom aproveitamento pelo organismo, não foram eficazes na prevenção da elevação do colesterol sérico e das alterações hepáticas vinculadas a esse processo.

Palavras-chave: Bagaço de azeitonas. Atividade antioxidante. Análises químicas. Ensaio em ratos Wistar.

ABSTRACT

Aiming to viability the use in human food of the olive pomace resulting from the extraction of olive oil by centrifugation in a two phase system were conducted two experiments. In the first experiment had as objective to test different treatments (water in ambient temperature, heated water, saline at 1%, saline at 2% and wet drying at 55 °C) and to obtain bagasse flour for each treatment, including its raw form. The experimental design was completely randomized design (CRD) with six treatments and three replications. The chemical analyzes were understand the chemical composition with dietary fiber, minerals, fatty acids profile, organic acids, phenolics, and total antioxidant activity *in vitro* by the methods, β -carotene/linoleic acid, DPPH and ABTS, the results indicated that the treatments used did not significantly altered the chemical composition of flour and all had a high dietary fiber content. High mineral content, especially potassium, were found in the flour, but the use of aqueous solutions promoted a reduction in these compounds. Emphasis is given to the low toxicity in relation to concentration of the lead mineral. In all flours, the oleic fatty acid presented at high levels, since the oxalic organic acid found in higher concentration in flours obtained with the treated waste. The treatments provided a significant drop in the levels of total phenolics and antioxidant capacity. In the second experiment aimed to evaluate the effect of flour obtained from treated olives bagasse obtained from olive oil extraction introduced into the diet of rats Wistar, especially in lipid control of these animals. The experimental design was a completely randomized design (CRD) with six treatments and seven replications. Chemical composition of flours obtained from raw residue and treated was made for adjustments of the macronutrients in standard AIN - 93M. During the experiment were analyzed dietary intake and weight development of rats. At the end, the feces were collected for analyzes of lipid content and total phenolics to obtain the coefficient of apparent digestibility of these compounds. After sacrificing the animals, it was held collection of blood plasma and liver section for analysis of serum lipids, transaminases liver weight and liver histology, respectively. The results indicated that rats fed with flour of olive pomace had no significant changes in food intake and had normal weight gain as the standard diet. The flours used in the diets showed good lipid and phenolic digestibility, but the increase of phenolic consumption promoted greater fecal loss of these compounds which may be reflected in feces with darker coloring. Rats subjected to inducing diets of increase cholesterol showed an increase of capillary caudal glycemic, but not having differed statistically from control, high levels of TC, LDL-c and decreases HDL-c, TG and VLDL. By the transaminases analysis only was evidenced the high level as the ALT or the group that received inducing diets of increase cholesterol with introduction

of 5% of flour from olive pomace. It was evident that phenolic contained in the olive pomace, although they submitted good use by the organism, were not effective in preventing the elevation of serum cholesterol and hepatic alterations linked to this process.

Keywords: Olive pomace. Antioxidant activity. Chemical analysis. Test in rats Wistar.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva pelo sistema de centrifugação de duas fases de Maria da Fé, MG 29
- Figura 2 Estruturas químicas de secoridoides comuns em *O. Europaea* L 38
- Figura 3 Produtos derivados da oleuropeína..... 40

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Fluxograma de obtenção das seis farinhas do bagaço de azeitonas oriundo da extração do azeite de oliva..... 65
- Figura 2 Ilustração das farinhas obtidas do bagaço de azeitonas bruto (A) e tratado em água à temperatura ambiente, por 24 horas (B) 72

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Diagrama das etapas do experimento *in vivo* 111
- Figura 2 Fezes de ratos Wistar alimentados com diferentes dietas..... 124
- Figura 3 Parênquima hepático de ratos *Wistar* alimentados com diferentes dietas indicando, pelos espaços em branco no citoplasma, presença de inclusões lipídicas. Coloração (H&E), aumento 40X, *Zoom* 2,0 135

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composição centesimal, fibra alimentar total (FAT), solúvel (FS) e insolúvel FI) das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva bruto e pós-tratamentos	74
Tabela 2	Perfil dos ácidos graxos, em porcentagem relativa, da fração lipídica das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva bruto e tratado	78
Tabela 3	Composição de minerais das farinhas do resíduo da extração do azeite de oliva bruto e tratado (mg/100 g).....	81
Tabela 4	Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos, por HPLC, nos extratos aquosos das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva na forma bruta e tratada	84
Tabela 5	Fenólicos totais e atividade antioxidante total (AAT) <i>in vitro</i> pelos métodos β -caroteno, DPPH e ABTS, nas farinhas do bagaço de azeitonas bruto e tratado	87

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Composição das seis dietas oferecidas aos animais experimentais (g/kg).....	110
Tabela 2	Composição centesimal das farinhas obtidas do bagaço de azeitonas, da extração do azeite de oliva, bruto e tratado liofilizado e triturado.....	116
Tabela 3	Valores médios diários de consumo das dietas (CMD), ganho de peso médio diário (GMD), coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e índice de massa corporal (IMC) dos animais, durante o experimento	118
Tabela 4	Conteúdo de lipídeos e fenólicos totais consumidos nas dietas e excretados nas fezes, expressos na matéria integral, peso das fezes excretadas pelos animais durante os três últimos dias do experimento e os valores das digestibilidades lipídicas (DL) e fenólicas (DF).....	121
Tabela 5	Valores de glicose capilar caudal, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-c, triacilglicerol e aminotransferases (AST e ALT) séricas de jejum de ratos Wistar submetidos a diferentes dietas	127
Tabela 6	Peso do fígado, peso do fígado/peso corporal total, de ratos <i>Wistar</i> submetidos a diferentes dietas	133

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS – ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6sulfônico
AGE - ácido gálico equivalente
AIN – 93M – American Institute of Nutrition
ALT – alanina aminotransferase
AOAC - Official Methods of Analysis
AST – aspartato aminotransferase
B-boro
C- = Controle negativo
C+ = Controle positivo
Ca- Cálcio
CEA – coeficiente de eficiência alimentar
CMD – consumo médio diário
Cr-cromo
Cu- cobre
DCNTs - doenças crônicas não transmissíveis
DF – digestibilidade fenólica
DIC – delineamento inteiramente casualizado
DL – digestibilidade lipídica
DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EC – *effective concentration*
ENN - extrato não nitrogenado
EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EVM - *Expert Group on Vitamins and Minerals*
FAAS - absorção atômica com chama de ar-acetileno
FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAT - fibra alimentar total
FB1% = 1% de farinha do bagaço bruto;
Fe-ferro
FI – fibra insolúvel
FS – fibra solúvel
FT1% - 1% de farinha do bagaço de azeitonas tratado;
FT5% - 5% de farinha do bagaço de azeitonas tratado;
FT10% - 10% de farinha do bagaço de azeitonas tratado;
FB 1% - 1% de farinha do bagaço de azeitonas bruto;
GG – Cromatógrafo a gás
GMD – ganho médio diário
GVH – gordura vegetal hidrogenada
HDL-c –lipoproteína de alta densidade

HNO₃ – ácido nítrico
IMC – índice de massa corporal
JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives
K- potássio
LDL-c – Lipoproteína de baixa densidade colesterol
Mg - Magnésio
Mn-Manganês
MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados
NaCl – Cloreto de sódio
Na-sódio
P- Fósforo
Pb-chumbo
PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados
S-enxofre
TAG – triacilgliceróis
UFV – Universidade Federal de Viçosa
USEPA - United States Environmental Protection Agency
VLDL-c - Lipoproteína de média densidade colesterol
WHO-World Health Organization
Zn-zinco

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva: características químicas, importância e formas de utilização.....	20
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
1.1	Objetivo geral	22
1.2	Objetivos específicos	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1	A oliveira e o azeite de oliva	23
2.2	Os resíduos de agroindústrias alimentícias.....	25
2.2.1	Considerações sobre resíduos agroindustriais.....	25
2.2.2	Os resíduos obtidos da extração do azeite de oliva e formas de utilização.....	28
2.2.3	Características físico-químicas dos resíduos da extração do azeite de oliva, sistema duas fases e três fases.....	32
2.2.3.1	Perfil lipídico do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva.....	33
2.2.3.2	Os carboidratos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva.....	34
2.2.3.3	Os compostos fenólicos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva.....	36
2.2.3.4	Pigmentos: clorofila e carotenoides do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva	41
2.2.3.5	Os ácidos orgânicos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva.....	43
2.2.3.6	Compostos inorgânicos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva.....	43
2.2.4	Funcionalidade dos constituintes do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva	44
	REFERÊNCIAS	53
	CAPÍTULO 2 Caracterização química e atividade antioxidante <i>In vitro</i> da farinha do bagaço de azeitona obtido da extração do azeite de oliva.....	59
1	INTRODUÇÃO	62
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1	Amostra.....	64
2.2	Tratamento da amostra e obtenção das farinhas do bagaço de azeitonas oriundo da extração do azeite de oliva	64
2.3	Composição centesimal com análise da fibra alimentar.....	65
2.4	Determinação de minerais das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva.....	66

2.5	Análise do perfil de ácidos graxos das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva	66
2.5.1	Extração dos ácidos graxos	66
2.5.2	Análise cromatográfica.....	67
2.6	Determinação de ácidos orgânicos das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva por HPLC	67
2.6.1	Extração dos ácidos orgânicos.....	67
2.6.2	Separação e quantificação dos ácidos orgânicos por HPLC.....	68
2.7	Determinação de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante <i>in vitro</i> das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva	68
2.7.1	Extração dos compostos fenólicos	68
2.7.2	Métodos da atividade antioxidante total	69
2.7.2.1	Método do sequestro do radical 2,2-difenil, 1picril-hidrazil (DPPH).....	69
2.7.2.2	Método sistema β -caroteno/ácido linoleico	69
2.7.2.3	Método do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)	70
2.8	Análise estatística.....	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
3.1	Obtenção das farinhas do bagaço de azeitonas bruto e tratado	72
3.2	Composição centesimal e fibra alimentar	72
3.3	Perfil de ácidos graxos.....	77
3.4	Composição de minerais.....	80
3.5	Ácidos orgânicos.....	83
3.6	Fenólicos totais e atividade antioxidante <i>In vitro</i>	86
4	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95
	CAPÍTULO 3 Efeito da farinha do resíduo da extração do azeite de oliva em dietas ricas em colesterol utilizadas por ratos wistar	101
1	INTRODUÇÃO	105
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.1	Amostra.....	107
2.2	Tratamento da amostra e obtenção das farinhas.....	107
2.2.1	Composição centesimal das farinhas do resíduo da extração do azeite de oliva.....	107
2.2.2	Ensaio <i>In vivo</i> e composição química da dieta	108
2.2.3	Controle da ingestão alimentar e desenvolvimento ponderal... ..	111
2.2.4	Determinação dos compostos fenólicos totais nas amostras	112
2.2.5	Análises da digestibilidade lipídica e dos fenólicos totais	112

2.2.6	Sacrifícios dos animais e coleta de amostras.....	113
2.2.7	Análise do lipidograma e das aminotransferases.....	114
2.2.8	Análise do peso do fígado e da histologia hepática	114
2.3	Análise estatística.....	115
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
3.1	Composição centesimal das farinhas dos bagaços de azeitonas bruto e tratado.....	116
3.2	Consumo alimentar, ganho de peso, coeficiente de eficácia alimentar e índice de massa corporal.....	117
3.3	Digestibilidade de lipídeos e fenólicos totais	120
3.4	Análise da glicose capilar caudal, lipidograma e aminotransferases séricas.....	126
3.5	Peso do fígado e histologia hepática dos ratos wistar	132
4	CONCLUSÃO	137
	REFERÊNCIAS	139
	ANEXO	144

CAPÍTULO 1

Bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva: características químicas, importância e formas de utilização

1 INTRODUÇÃO GERAL

É crescente a preocupação das autoridades sanitárias quanto ao destino dos resíduos agroindustriais, muitas vezes descartados de forma incorreta e que podem, ainda, por possuírem nutrientes e compostos bioativos, ser reutilizados pela indústria de alimentos. Com o uso de resíduos, buscam-se novas e melhores alternativas alimentares que visam atender a uma das exigências mais marcantes dos consumidores, que é seu aspecto quanto aos benefícios à saúde, além de propiciar a redução no impacto ambiental. Assim, conjugando as questões ambientais ao interesse da saúde humana, justificam-se os estudos com o resíduo obtido da extração do azeite de oliva, que tem sido um dos produtos que, na atualidade, vêm aumentando sua frequência de consumo, sobretudo no Brasil, devido à comprovação de seus benefícios à saúde humana.

O bagaço das azeitonas é um subproduto do processo da produção do azeite de oliva que é gerado de diferentes formas e composições, de acordo com o equipamento de extração usado, a variedade da oliva e a maturidade do fruto. Na centrífuga, usando o processo contínuo de três fases, os resíduos produzidos compreendem o resíduo líquido da água de vegetação *olive mill waste-water* (OMW) e o bagaço, que é o resíduo sólido. O bagaço, ao sofrer nova extração, produz o óleo do bagaço, enquanto o resíduo aquoso é usualmente descartado na terra, nos rios, nos lagos ou nos mares, causando vários problemas ambientais (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010b). Ao se utilizar um sistema de duas fases para a produção do azeite, elimina-se o problema, originando um

novo resíduo chamado “alpeorujo” ou *two-phase olive pomace* (TPOP), que é uma massa espessa constituída da polpa e caroços da azeitona, bem como a água de vegetação. Assim, tem um teor de umidade na faixa de 55% a 70% e contém também azeite residual (2% a 4%) e 2% de cinzas, com 30% de potássio (BORJA; RINCÓN, 2006).

O TPOP também contém quantidades apreciáveis de ácidos oleanólico e maslínico (BORJA; RINCÓN, 2006) e, segundo alguns estudos, esse subproduto da extração do azeite de oliva também contém quantidade apreciável de pectina, com boa capacidade de geleificação, além das suas propriedades funcionais no combate a uma série de doenças, o que tem conduzido à extração desse material para o desenvolvimento de uma ampla gama de produtos alimentícios enriquecidos com fibras (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010a).

Vários são os estudos que demonstram o papel do azeite de oliva no combate às doenças cardiovasculares, por ter um perfil de ácidos graxos de qualidade, como os ácidos graxos monoinsaturados (*mono unsaturated fatty acid*, MUFAS) e também a presença de vários compostos fenólicos que são reconhecidos como potentes antioxidantes e envolvidos na proteção contra várias doenças. Contudo, como consequência do processo de extração do azeite, a fração hidrossolúvel, rica em compostos fenólicos, encontra-se predominantemente no bagaço (98%) sendo, portanto, descartada (DEJONG; LANARI, 2009). Devido a isso, a extração e o desenvolvimento de um extrato bruto de polifenóis, têm sido investigados pelos pesquisadores, como medida de adicionar valor a um subproduto e reduzir o impacto ambiental do resíduo.

Contudo, mesmo frente às várias características químicas encontradas nos resíduos obtidos da extração do azeite de oliva, poucos são os estudos nos quais se relaciona o uso do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva em produtos alimentícios e seus efeitos funcionais. Assim, visto a necessidade de novos estudos nesta área, o presente trabalho foi realizado com o

propósito de viabilizar a utilização do resíduo da extração do azeite de oliva, produzido na cidade de Maria da Fé, MG, para fins alimentícios, de maneira a contribuir para um manejo adequado e o consumo sustentável do mesmo, conjugando suas propriedades e importantes constituintes aos benefícios à saúde humana.

1.1 Objetivo geral

Tratar e caracterizar, química e biologicamente, o resíduo obtido da extração do azeite de oliva obtido da fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Maria da Fé, MG.

1.2 Objetivos específicos

- a) coletar o resíduo da extração do azeite de oliva da fazenda experimental da EPAMIG em Maria da Fé, MG;
- b) testar tratamentos com o resíduo para a eliminação de parte dos seus compostos responsáveis pelo amargor característico da oliva;
- c) obtenção de farinha do resíduo bruto e tratado;
- d) realizar a caracterização química das farinhas do resíduo bruto e tratado por meio das análises: composição centesimal, teor de minerais, fibra alimentar (solúvel, insolúvel), perfil de ácidos graxos, ácidos orgânicos e de compostos fenólicos e análise da atividade antioxidante *in vitro*;
- e) verificar a ação das farinhas do resíduo bruto e tratado, em ensaio *in vivo*, por meio da análise do consumo alimentar, do ganho de peso, da digestibilidade lipídica e dos fenólicos totais, e a ação sobre o perfil lipídico plasmático, glicemia e análise histológica do fígado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A oliveira e o azeite de oliva

A oliveira (*Olea europaea* Linné), Família Oleaceae, é uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem e foi introduzida na bacia do Mediterrâneo por fenícios e sírios, nos primórdios da civilização sendo seu uso, tanto na alimentação quanto medicinal, difundido por gregos e romanos (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005).

Com a descoberta da América (1492), o cultivo das oliveiras se expandiu para além do Mediterrâneo. A primeira oliveira foi levada de Sevilha para o oeste da Índia e, mais tarde, para o continente americano. Aproximadamente 1.560 pomares estavam sendo cultivados no México, depois, mais tarde, no Peru, no estado norte-americano da Califórnia, no Chile e na Argentina. Em tempos atuais, o plantio das oliveiras continua sua expansão para além do Mediterrâneo, em locais bastante afastados de sua origem, como o sul da África, a Austrália, o Japão e a China (INTERNATIONAL OLIVE OIL - IOC, 2011).

O fruto da oliveira, a azeitona, é utilizado para comercialização na forma de conserva para consumo em mesa e, também, de seu processamento se extrai o azeite, denominado azeite de oliva.

A azeitona apresenta como constituintes, em média, 50% de água, 1,6% de proteínas, 22% de óleo, 19,1% de carboidrato, 5,8% de celulose e 1,5% de minerais (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005). Tem sabor forte e amargo, devido à presença de oleuropeína, impedindo seu consumo direto e sendo necessário o uso de alguns processos para sua utilização na alimentação. Tais processos podem diferir de acordo com a região e também a variedade do fruto. As técnicas mais usadas para a retirada da oleuropeína são o tratamento

com hidróxido de sódio ou potássio, a salmoura ou sucessivas lavagens com água. Contudo, existem algumas azeitonas, como no caso da variedade Trubolea, na Grécia, que, com o processo de amadurecimento, se tornam mais doces e, em muitos casos, isto se deve ao processo de fermentação (IOO, 2011).

Denomina-se azeite de oliva o material lipídico extraído do fruto maduro colhido da oliveira.

As etapas de elaboração do azeite de oliva, conforme Uceda et al. (2006), compreendem:

- a) operações prévias: recepção do fruto, caracterização do fruto, adequação da azeitona, limpeza, lavagem e armazenamento do fruto;
- b) preparação da pasta: moagem e batimento;
- c) separação das fases sólidas e líquidas: prensa, centrifugação (sistema de duas fases e sistema de três fases);
- d) separação de fases líquidas: decantação natural e centrifugação;
- e) armazenamento e maturação do azeite.

Esse é o modo de produção de um azeite natural sem nenhum processo químico. Trata-se de uma tarefa difícil, demorada e pouco rentável, pois, para cada 5 kg de azeitonas, produz-se, em média, apenas 1 litro de azeite. Porém, este azeite conserva melhor seus componentes, entre os quais estão os polifenóis agliconados, responsáveis pelo odor do azeite. No entanto, no processamento com o uso de solventes (azeites refinados), boa parte destes compostos fenólicos é perdida. Isso ocorre também quando o azeite é alcalinizado, para reduzir a acidez. A acidez elevada acarreta características organolépticas pobres e não é próprio para consumo humano, a menos que seja refinado. O azeite de oliva próprio para o consumo humano deve ter uma acidez, de acordo com a classificação do azeite de oliva, que pode ser, no máximo, de 3,3%. Assim, existe o padrão de identidade e qualidade para o azeite de oliva que está descrito

no Codex Alimentarius e nas normas da União Europeia que se baseiam, principalmente, na composição em ácidos graxos e em esteróis, e alguns parâmetros físico-químicos de qualidade (CARDOSO, 2006).

O consumo de azeite de oliva tem sido, cada vez mais, vinculado a benefícios à saúde humana, devido ao seu perfil de ácidos graxos, constituído, principalmente, de ácido oleico e também pela presença de compostos fenólicos, principalmente o fenol hidroxitirosol (HT) simples e o complexo de oleuropeína (OE), composto resultantes da esterificação do HT com o elenólico. Segundo alguns estudos, esse benefício se relaciona com a redução da oxidação da lipoproteína plasmática carreadora de colesterol, lipoproteína de baixa densidade e LDL-c (BOSKOU, 2000; CARDOSO, 2006; COVAS; KONSTANTINIDOU; FITÓ, 2009).

O teor dos compostos fenólicos no azeite dependerá de alguns fatores, como o cultivo da oliveira, o clima, o grau de maturação, a infestação possível pela mosca *Dacus olea* da oliva e pelo processamento (BOSKOU, 2000).

2.2 Os resíduos de agroindústrias alimentícias

2.2.1 Considerações sobre resíduos agroindustriais

A população mundial produz uma grande quantidade de lixos e resíduos. Diferentemente de “lixo”, o resíduo tem valor econômico agregado.

É interessante observar que, entre os temas de grande preocupação mundial, encontram-se, de um lado, a falta de alimentos e a inadequada utilização deste, gerando, em vários países, o problema da “fome” e, do outro, a quantidade e a ação prejudicial dos resíduos industriais, ressaltando os agroindustriais, ao meio ambiente. Assim, os países desenvolvidos e em

desenvolvimento têm trabalhado constantemente no estudo e nas soluções para estas temáticas. Talvez, a solução de um dependa do outro (LOPES et al., 2008).

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo, entretanto, esses resíduos e/ou subprodutos não podem, muitas vezes, ser considerados como lixo, pois têm valor econômico agregado, por possibilitarem reaproveitamento, no mínimo, no próprio processo produtivo. E é na busca de novas viabilizações de uso dos resíduos que as indústrias conseguirão diminuir os impactos dos mesmos na natureza (LOPES et al., 2008).

Os resíduos sólidos agroindústrias (bagaços, tortas, restos de frutas e hortaliças, etc.) são constituídos por aqueles provenientes de usinas sucroalcooleiras, matadouros e indústrias do processamento de carnes (vísceras e carcaça de animais), frutas e hortaliças (bagaço, tortas, refugo e restos), indústria da celulose e papel (resíduos da madeira, lodo do processo de produção e do tratamento de águas residuais), curtumes (aparas de couro e lodo do processo e tratamento de águas residuais), sendo sua produção, geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima.

Geralmente, os resíduos são de dois tipos, o das águas residuais e o resíduo sólido. As águas residuais podem ser o resultado de lavagem do produto, escaldamento, cozimento, pasteurização, resfriamento e lavagem do equipamento de processamento e das instalações. Águas residuais do processamento de produtos animais, tal como as geradas em laticínios, matadouros e curtumes, são muito poluidoras, podendo conter gordura, sólidos orgânicos e inorgânicos, além de substâncias químicas que podem ser adicionadas durante as operações de processamento, enquanto águas residuais geradas no processamento de produtos de origem vegetal podem conter, além de elevado conteúdo de material orgânico, outros poluentes, tais como solo, restos de vegetais e pesticidas (MATOS, 2005).

O maior impacto provocado por resíduos sólidos orgânicos é decorrente da fermentação do material, quando pode ocorrer a formação de ácidos orgânicos (“chorume” – líquido de elevada demanda bioquímica de oxigênio, DBO, formado com a degradação do material orgânico e a lixiviação de substâncias tóxicas), com geração de maus odores e diminuição do oxigênio dissolvido em águas superficiais (MATOS, 2005).

Apesar da potencialidade de produzir alimentos, as indústrias apresentam uma realidade preocupante no oferecimento de alimentação de baixo custo que supra as necessidades diárias de nutrientes para a população de baixa renda. Assim, o aproveitamento de resíduos agroindustriais, como fontes alternativas de alimentos acessíveis à população carente, tem sido tópico de pesquisas científicas e tecnológicas, extensivas nas últimas décadas, a fim de se obter o conhecimento de seus principais constituintes para que sejam adequadamente aproveitados e agregando-lhes valores.

Contudo, apesar de muitos resíduos conterem teores satisfatórios de nutrientes, fazem-se necessárias a avaliação da biodisponibilidade e a realização de estudos que revelem a inexistência de compostos tóxicos, incluindo os alergênicos, antes de sua incorporação na dieta tradicional. Tais estudos podem ser efetuados por meio de ensaios biológicos com animais, por meio de evidências físicas ao longo do tratamento e análises bioquímicas que realmente comprovem que o subproduto oriundo do resíduo constitui uma alternativa alimentar isenta de riscos à saúde humana. Além disso, e não menos importante, é necessário averiguar a aceitabilidade dos consumidores por meio de testes sensoriais adequados.

2.2.2 Os resíduos obtidos da extração do azeite de oliva e formas de utilização

Na produção do azeite de oliva, diferentes resíduos são gerados, dependendo do método de extração que, de maneira geral, ocorre em três etapas: a moagem para a destruição da estrutura do tecido da planta; a batidura, fase contínua para retirada do óleo disperso na pasta moída e a separação sólido-líquido, que consiste na separação do óleo contido na pasta. Industrialmente, esta última etapa se processa de diferentes modos.

Até a década de 1990, o sistema de centrifugação ocorria em três fases, com a produção, além do azeite de oliva puro, de dois resíduos, o “alpechin”, resíduo aquoso e o “operujo”, resíduo sólido (bagaço da oliva). O primeiro é extremamente perigoso para o meio ambiente, devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio e o segundo com teor considerável de óleo, cerca de 3% (ARJONA; GARCÓA, 1999). A elevada carga orgânica poluente e fitotóxica, a qual resiste à degradação biológica, provoca efeitos prejudiciais sobre a fauna e flora das áreas expostas. De maneira a melhorar a técnica de centrifugação, o sistema de duas fases tem sido adotado com a produção de dois resíduos, o azeite de oliva e o “alperujo”, que é uma mistura do resíduo sólido (bagaço ou bolo de oliva) e a água de vegetação (Figura 1). Essa tecnologia reduz consideravelmente o volume de efluentes da agroindústria e os problemas de sua eliminação, mas dá origem a uma lama espessa de bagaço de oliva úmido. Comumente, este resíduo tem sido utilizado como fertilizante, combustível ou na alimentação animal, após algum tratamento (ALÚDATT et al., 2010). Assim, o “alperujo” constitui uma lama espessa com teor de umidade de aproximadamente 65% e com ainda uma grande porcentagem de óleo, o que faz algumas indústrias realizarem uma segunda centrifugação para a obtenção do

azeite de oliva do bagaço (GALLARDO-GUERRERO; ROCA; MOSQUERA, 2002).



Figura 1 Bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva pelo sistema de centrifugação de duas fases de Maria da Fé, MG

Segundo Alúdatt et al. (2010), a indústria de azeite de oliva produz 35 kg do bolo de oliva (resíduo sólido) e 440 litros da água de vegetação (resíduo líquido) por 100 kg de oliva tratada, no sistema de três fases.

Segundo Centre D'Initiative Pour la Production Propre - CIPP (2000), em média, 100 kg de azeitonas produzem cerca de 20 kg de azeite, podendo variar em função de uma série de fatores, dentre eles o sistema de extração, e produzem igualmente os efluentes e os seguintes resíduos:

- a) 40 kg de bagaço (35% de umidade) + 40 kg de águas residuais, com a utilização do sistema tradicional de prensas;
- b) 55 kg de bagaço (50% de umidade) + 100 kg de águas residuais, com a utilização do sistema contínuo a três fases;
- c) 70 kg de bagaço (superior a 60% de umidade) + 10 kg de águas residuais, com a utilização do sistema contínuo a duas fases.

Portanto, o tratamento e a eliminação do resíduo do beneficiamento do azeite estão entre os mais sérios problemas ambientais nos países do Mediterrâneo, por serem os maiores produtores, tais como Espanha, Itália e Grécia. Porém, o Brasil, particularmente o estado de Minas Gerais, que vive hoje um momento especial na olivicultura, deve, desde já, procurar alternativas para o reaproveitamento do resíduo, as quais acompanhem paralelamente o crescimento da produção brasileira de azeitona e azeite, para que, dessa forma, previnam-se danos futuros e impactos ambientais de grande porte.

Esses resíduos não são considerados lixo, por possuírem valor econômico agregado, já que podem ser reaproveitados, no mínimo, no próprio processo produtivo. E é na busca de novas viabilizações de uso desses resíduos que as indústrias conseguirão diminuir os impactos dos mesmos a natureza (LOPES et al., 2008). Assim, são crescentes os estudos sobre os métodos de extração do azeite, de forma a minimizar a geração de resíduos, obtendo maior rendimento no processo, mas também crescem os estudos sobre os resíduos, nos quais tem sido demonstrado o potencial desse material como fonte natural para o isolamento de substâncias como compostos fenólicos, açúcares fermentáveis, manitol, oligossacarídeos e fibras, entre outros (RODRÍGUEZ et al., 2007).

No momento, as formas mais utilizadas desses resíduos, registradas na literatura, compreendem óleo residual, ração animal, adubo (compostagem), herbicida ou pesticida (CABRERA et al., 2010), extração de componentes orgânicos (pectina, antioxidantes e enzimas), na participação de outros produtos, como álcoois, biossurfactantes, biopolímeros, carvão ativado, além de ser empregado na obtenção de energia (MARKET..., 2012).

Na indústria de alimentos especificamente, tais resíduos não têm tido aplicabilidade, apesar de vários pesquisadores considerarem, por suas características físico-químicas, uma fonte natural e barata de uma série de importantes compostos, sobretudo os fenólicos. Mas, novas metodologias têm

sido testadas e desenvolvidas, de forma a extrair um ou mais desses compostos, principalmente os de ação antioxidante, de forma a serem utilizados em alimentos, sobretudo aqueles mais susceptíveis à oxidação, em substituição aos antioxidantes artificiais, já que com estes têm sido registrados problemas à saúde humana (VISSERS; ZOCK; KATAN, 2004).

Portanto, com os estudos crescentes sobre métodos de extração, o “alperujo”, como é chamado o bagaço de azeitonas obtido por centrifugação no sistema de duas fases, na Espanha, tem sido utilizado como fonte natural para o isolamento de substâncias como compostos fenólicos, açúcares fermentáveis, manitol, oligossacarídeos e fibras, entre outros (RODRÍGUEZ et al., 2007).

Em relação aos antioxidantes presentes em resíduos, em alguns estudos foi demonstrado que eles apresentam quantidades apreciáveis de tais compostos, como no caso do hidroxitirosol, com concentração 10 a 100 vezes mais alta que no azeite de oliva. Muitos estudos têm focado no desenvolvimento de métodos para a purificação do hidroxitirosol da água de vegetação dos resíduos industriais do azeite de oliva, devido à sua alta atividade antioxidante, propriedade com valor funcional e estabilidade do azeite de oliva. Assim, como há um interesse crescente pelos antioxidantes naturais, já que os artificiais têm sido substituídos por estarem relacionados com efeitos indesejáveis à saúde humana, muitos pesquisadores têm visto no resíduo do beneficiamento do azeite uma fonte potencial desses compostos (LAFKA et al., 2011).

Súares et al. (2009) cita que, com o desenvolvimento de procedimentos para a extração dos diferentes compostos fenólicos do resíduo, este poderia ser empregado para o enriquecimento do óleo de oliva e, assim, aumentar a ingestão de compostos fenólicos sem, contudo, aumentar a ingestão calórica com o consumo de azeite de oliva virgem.

Também tem sido testada a atividade de biofenóis puros e aqueles recuperados do resíduo contra patógenos humanos. Obied et al. (2007),

avaliando duas variedades de oliveiras quanto ao conteúdo de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante e antimicrobiana, constataram que os extratos de ambas as variedades mostraram ampla atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, os biofenóis individuais (hidroxitirosol, luteolina, oleuropeína) mostraram atividade mais limitada. Também apresentaram atividade molluscicidal contra *Isidorella newcombi*.

Outra forma de extração que vem sendo investigada no resíduo é a do seu material péctico. Esta substância tem sido explorada devido à sua capacidade gélida, podendo atuar como substituto de gordura em vários produtos alimentícios, como a carne e seus derivados. Isto se deve a uma crescente demanda pelos consumidores por produtos mais saudáveis, o que estimula o desenvolvimento de produtos cárneos com baixo teor de gordura e alterado no perfil de ácidos graxos (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010a).

Assim, constata-se que a busca para o uso do resíduo tem sido focada, principalmente, na extração de seus constituintes, sobretudo os fenólicos, para ser utilizado pela indústria de alimentos.

Apesar dos vários estudos relatando, quantificando e demonstrando a importância dos constituintes presentes no resíduo do beneficiamento do azeite, não se encontram estudos relacionando métodos ou técnicas de se tratar o resíduo para uso na alimentação humana.

2.2.3 Características físico-químicas dos resíduos da extração do azeite de oliva, sistema duas fases e três fases

As características físico-químicas dos resíduos da extração do azeite de oliva obtidos tanto do sistema de centrifugação de duas fases quanto do de três fases podem variar de acordo com o método de extração do óleo, o seu

tratamento subsequente e, em menor extensão, a variedade da oliveira e as condições ambientais (VERA et al., 2009).

Esses resíduos se constituem de mistura composta por alta porcentagem de água, compostos orgânicos como azeite residual, açúcares, fibras, polifenóis, compostos nitrogenados, ácidos voláteis, além de tocoferóis, pigmentos como clorofila e carotenoides e os compostos inorgânicos, principalmente potássio, sais e fosfatos (LAFKA et al., 2011).

O teor de umidade no resíduo, obtido pelo sistema de centrifugação de duas fases, se encontra na faixa de 55% a 70% e depende da maturidade do fruto e do processo de extração, em que a água pode ser adicionada.

Galanakis, Tornberg e Gekas (2010b) informa que o resíduo obtido da extração do azeite é uma mistura composta de 83-94 g de água, 4-16 g de compostos orgânicos (açúcares, compostos nitrogenados, ácidos voláteis, gordura, polifenóis e fibras) e compostos inorgânicos 0,4-2,5 g (principalmente potássio, sais e fosfatos) por 100 g de peso fresco.

Em geral, a maioria dos compostos encontrados no fruto da oliveira e azeite é evidenciada nos resíduos gerados. No entanto, com o processamento para a obtenção do azeite, algumas transformações contribuem para a variação no teor e no tipo desses constituintes, o que irá caracterizar tais resíduos.

2.2.3.1 Perfil lipídico do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliveira

O teor lipídico do resíduo obtido pelo sistema de centrifugação de duas fases, úmido, varia entre 2% e 4%. Esse teor é muito variável, principalmente devido à cultivar da oliveira e ao processo de extração, assim também em relação ao perfil de ácidos graxos que, comumente, segue o encontrado nos azeites. Estes, de maneira geral, apresentam como ácido graxo de maior

concentração o oleico (68,3% a 73,3%), seguido pelo ácido palmítico (12,3% a 13,6%) e o linoleico (9,6% a 11,9%) (BORJA; RINCÓN, 2006).

Alguns autores consideram o perfil de ácidos graxos do azeite de oliva variável entre as cultivares e outros não evidenciam grandes diferenças. Porém, muitos constataam que a maturação das azeitonas influencia seu perfil de ácidos graxos e, assim, o teor de ácidos graxos encontrado no azeite. Notam que, durante o amadurecimento das olivas, o ácido oleico, que aparece em maior concentração, aumenta gradativamente chegando a um pico com posterior redução, até um valor estável, o mesmo acontecendo com o ácido linoleico. Outros evidenciam que, com o processo de amadurecimento, em algumas variedades, o ácido oleico reduz e o linoleico aumenta, devido à ação enzimática. Quanto aos ácidos graxos saturados verifica-se uma redução com o processo de maturação das azeitonas (MENZ; VRIESEKOOOP, 2010).

Vera et al. (2009), avaliando a estabilidade do resíduo seco quando estocado, concluíram que o resíduo da extração do azeite, quando desidratado, pode ser conservado durante vários meses, sem prejuízo da sua composição lipídica e de sua qualidade. Esta é uma descoberta importante, já que a produção do resíduo é sazonal e a sua utilização pode se estender por vários meses.

2.2.3.2 Os carboidratos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

Em relação a esses compostos verifica-se que a glicose é um dos principais açúcares solúveis presentes na polpa da azeitona, junto com pequenas quantidades de sacarose, frutose e uma quantidade significativa do poliol chamado manitol. Os polissacarídeos na parede celular da azeitona são compostos de hemicelulose, celulose e pectina. Tais fibras têm sido exploradas pelos pesquisadores, já que têm certas propriedades funcionais, ajudando na

prevenção e no tratamento de uma série de doenças, como alguns tipos de câncer. Devido a esta importância e à propriedade gélica de algumas fibras, uma ampla gama de produtos alimentícios enriquecidos com esses compostos tem sido desenvolvida. Assim, existe uma tendência ao uso de resíduos do processamento de frutas e vegetais que, geralmente, não têm valor comercial e são descartados, muitas vezes de forma incorreta, e que têm quantidade apreciável de fibras que, sendo recuperadas, podem ser utilizadas na preparação de alimentos com alegação de propriedades funcionais. Há vários registros, na literatura, de enriquecimento de produtos cárneos com fibra extraída de várias fontes, em substituição à gordura, de maneira a se obter um produto mais saudável, com baixo teor de calorias e reduzido em gordura do tipo saturada.

Dessa forma, pesquisadores vêm isolando o extrato pécico do bagaço de azeitona úmido e investigando sua propriedade reológica. De acordo com seus experimentos, a habilidade gélica do extrato é comparável à da pectina de baixa metoxilação comercial, o que sugere uma nova fonte potencial de material de gelificação (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010b).

Galanakis, Tornberg e Gekas (2010b) desenvolveram novo método para a recuperação de fibra dietética contida no resíduo aquoso, do sistema de três fases, da extração do azeite de oliva, para isolar o resíduo insolúvel a álcool. Obtiveram extração máxima de 64,8 g/100 g da matéria seca, correspondendo a um total de fibra de 5,1 g/100 g do resíduo insolúvel em álcool, o qual apresentou alto conteúdo de potássio (8,4 g/100 g) e baixo em ácido galacturônico (3,3 g/100 g). Apesar do baixo teor do ácido galacturônico, foi capaz de formar gel após a extração da fração solúvel. A fibra solúvel foi composta exclusivamente por pectina, sendo 93,9 e 6,1 mol/100 mol de ácido galacturônico e arabinose, respectivamente. Verificaram que a rigidez e a elasticidade do gel aumentaram exponencialmente em relação ao teor de ácido galacturônico.

Além disso, as hemiceluloses são ricas, principalmente, em ácido xilan e xiloglucanas e estes subprodutos podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de açúcar fermentável ou como fonte de manitol (FERNÁNDEZ-BOLAÑOS et al., 2004).

Portanto, o resíduo tem sido, também, utilizado para a recuperação do material contendo a pectina, com potencial para utilização como agente gélico, pela indústria de alimentos.

2.2.3.3 Os compostos fenólicos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

Segundo Alúdtatt et al. (2010), o azeite de oliva contém 2% do total do conteúdo fenólico das azeitonas inteiras, enquanto o remanescente de 98% está presente no bagaço. Isso se dá pela natureza polar da maioria desses componentes. Em geral, essa superioridade em fenólicos pode ser evidenciada quando comparada à encontrada na maioria das frutas e vegetais, considerados importantes fontes desses compostos.

O complexo fenólico, no fruto imaturo da azeitona, é formado, principalmente, de oleuropeína, verbascosídeo e ligstrosídeo que, durante a maturação, dão origem ao hidroxitirosol (HT) e outros fenólicos simples, como tirosol (T), álcool homovanilínico (HVA1c), ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DHPAC), ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido filorético e ácido vanílico (KOUNTOURI et al., 2007).

Durante o processo de extração do azeite extravirgem, o esmagamento das azeitonas produz destruição do fruto e o amassamento conduz à mistura do conteúdo celular. Esses processos exercem grande mudança na composição dos compostos fenólicos no azeite e no bagaço, devido à atividade de enzimas relacionadas à biogeração de fenóis, como α -glicosidase e esterase e de

enzimas oxidativas, tal como polifenol oxidase, peroxidase e lipoxigenase (esta última forma os voláteis responsáveis pelo aroma do azeite) (INAREJOS-GARCÍA; FREGAPANE, 2011) Como consequência, uma cadeia de reações produzirá mudanças na estrutura molecular da oleuropeína e ligstrosídeo, levando à formação dos derivados de secoiridoides agliconas, sendo os mais abundantes no resíduo (LAFKA et al., 2011; SÚAREZ et al., 2009). Assim, surgem os compostos hitroxitirosol, 2-(3,4-di-hidroxifenil) etanol e seus derivados, e o tirosol e seus derivados (sendo o principal denominado oleocantal). Portanto, alguns pesquisadores indicam que a maioria dos compostos fenólicos nos produtos da oliveira está presente em sua forma livre (75%-90% do conteúdo total de fenólicos), enquanto somente uma pequena proporção (10%-25%) estava na forma ligada (ALÚDATT et al., 2010) (Figura 2).

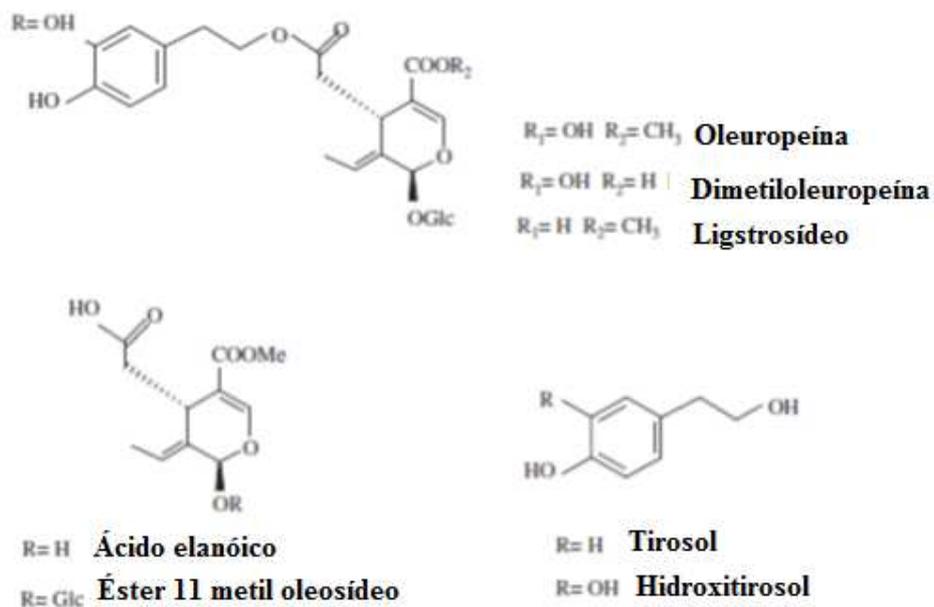


Figura 2 Estruturas químicas de secoroides comuns em *O. Europaea* L
 Fonte: Alúdtatt et al. (2010)

Assim, no bagaço de azeitonas, os principais compostos fenólicos encontrados têm sido hidroxitirosol, oleuropeína, tirosol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido elenólico, catecol e rutina, além de pequenas concentrações de flavonoides e lignanas (acetoxipinoresinol e pinoresinol). Contudo, a quantidade e o tipo desses compostos no resíduo sólido dependem da cultivar e da maturidade do fruto, das condições climáticas, do tempo de armazenamento e da técnica de processamento (GARCÍA et al., 2008).

Na fase de decantação horizontal do azeite, os compostos fenólicos são distribuídos nas diferentes fases, de acordo com a sua afinidade pela água ou óleo e, como resultado, quase todos os compostos fenólicos presentes no fruto da oliveira ficam retidos no resíduo (SÚAREZ et al., 2009). Assim, a quantidade de água utilizada durante o processo de extração irá afetar a concentração dos compostos fenólicos. Quando a quantidade de água é grande, são separados mais

polifenóis do azeite pela solubilização dos compostos polares. Os azeites produzidos em sistemas de duas fases não têm água de descarte e, assim, apresentam concentrações mais altas em compostos fenólicos, tornando-os mais estáveis à auto-oxidação (GÓMEZ-GONZÁLEZ; RUIZ-JIMÉNEZ; CASTRO, 2010).

A azeitona não é comestível por causa de seu alto conteúdo em um glicosídeo amargo denominado oleuropeína, o qual é formado por glicose, ácido elenólico e *o*-diphenol hidroxitirosol. A concentração deste secoiridoide glicosídeo nos frutos depende de muitos fatores, como variedade, irrigação e grau de amadurecimento. Com efeito, os níveis de oleuropeína nas azeitonas diminuem significativamente com a maturação (GARCÍA et al., 2008).

Alguns autores relatam que o perfil sensorial do azeite é afetado pela composição em compostos fenólicos, já que vários estudos demonstram uma relação positiva entre amargor, pungência e adstringência com a concentração desses compostos. Por isso, essas características são mais evidentes no azeite extravirgem, já que ele tem maior quantidade desses compostos considerados atributos premiados do azeite (GACHONS et al., 2011).

Porém, ainda não está claro qual a contribuição de cada fenólico nesses atributos. Alguns autores relacionam o amargor e a pungência com derivados de secoiridoídeos, mas outros compostos também têm sido correlacionados com essas características como oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA), forma dialdeídica da oleuropeína dicarboximetil (3,4-DHPEA-EDA) e forma dialdeídica do ligstrosídeo decarboximetil (*p*-HPEA-EDA). Muitos demonstram a intensidade amarga significativamente correlacionada com a oleuropeína aglicona (SILIANI et al., 2006).

Segundo García et al. (2008), a oleuropeína gliconada é amarga. Porém, algumas alterações em sua estrutura, propiciadas por fatores inerentes ao fruto e/ou processamento das azeitonas, poderão conduzir à formação de alguns

derivados com diferentes graus de amargor, conforme descrito na Figura 3. A quebra da ligação éster (por álcali, por exemplo) produz hidroxitirosol (não amargo) e outro composto, oleosídeo 11-metil éster, também não amargo. A quebra da ligação glicosídica produzirá uma oleuropeína aglicona que é amarga. E, no caso da oxidação da oleuropeína, produzirá uma oleuropeína quinona, considerada não amarga.

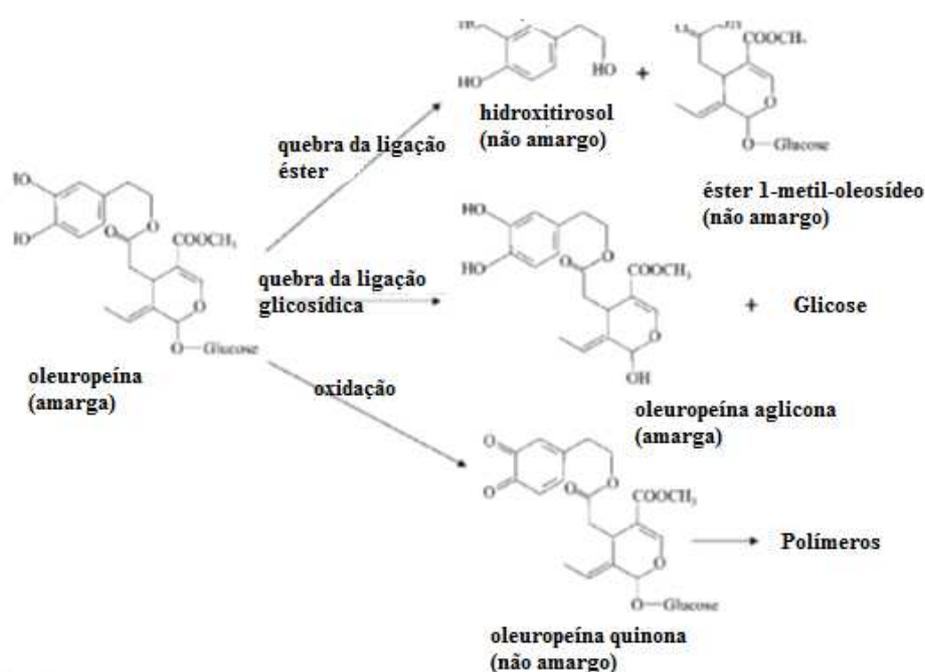


Figura 3 Produtos derivados da oleuropeína

Fonte: García et al. (2008)

Segundo Lafka et al. (2011), o hidroxitirosol está relacionado com o sabor amargo do azeite e é solúvel em água. Já o tirosol e seus derivados, sobretudo o oleocantal, são, principalmente, associados com a pungência notada no azeite virgem.

Contudo, além dos compostos fenólicos, os azeites extravirgens apresentam também os voláteis responsáveis pelo *flavor* (aroma e sabor). O total

de 80% desses compostos voláteis vem da via da lipoxigenase e é responsável pelos atributos de cor (verde) e aroma frutado. Assim, tem-se que o hexanal é responsável pelo atributo sensorial maçã e o aldeído E-2-hexenal, responsável pelo atributo amêndoa. Estes dois compostos foram encontrados em maior quantidade no azeite extravirgem. Ésteres C6 em azeites virgens contribuem para os atributos sensoriais positivos: "doce", "fruta" e "folha verde". O composto Z-3-hexenol é responsável pelo odor de grama cortada e poderia ter um papel no amargor dos azeites e também se encontra em maior concentração no azeite extravirgem. A redução desses compostos no azeite virgem está relacionada com as condições drásticas de fabricação, levando à perda desses compostos e das atividades enzimáticas relacionadas à biodegeneração e à transformação dos voláteis, afetada pelo dano ao fruto (INAREJOS-GARCÍA et al., 2010).

Outro composto fenólico que é encontrado no azeite, mas em menor concentração por sua natureza polar, é o pigmento antocianina, presente nas azeitonas de cor roxa, por se acumularem durante o período de maturação na pele e polpa, sendo, assim, encontrado em maior quantidade no resíduo, para proteger o material genético de exposição à luz solar e os lipídeos da oxidação (PASQUALONE et al., 2012).

2.2.3.4 Pigmentos: clorofila e carotenoides do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

Avaliando a composição, a concentração e o grau de transferência dos pigmentos encontrados na azeitona, no azeite e no bagaço, verifica-se que a concentração dos pigmentos clorofila e carotenoides depende também do grau de amadurecimento do fruto e, que à medida que ocorre esse amadurecimento, há uma redução dos pigmentos, porém, perda maior é evidenciada para a

clorofila que para os carotenoides. Verifica-se que, durante o processamento do azeite, ocorre uma perda de 80% da fração clorofila e 50% da fração carotenoides e que esta perda é devido, principalmente, à retenção no resíduo, em vez da destruição durante o processo. Assim, evidencia-se que a fração clorofila é essencialmente encontrada no bagaço, enquanto os carotenoides são transferidos em grande proporção para o azeite. A consequência disso é que a taxa, ou relação, clorofila/carotenoide é mais baixa nos azeites que nos frutos (GALLARDO-GUERRERO; ROCA; MOSQUERA, 2002).

A intensidade cromática do azeite está relacionada a dois pigmentos, a clorofila e os carotenoides, estes em maior concentração, por sua natureza apolar. No bagaço ocorre o contrário, encontra-se mais clorofila. Dentro de cada classe desses dois compostos existem vários tipos, com tons diferentes. Com o processamento das azeitonas para a obtenção do azeite (esmagamento, moagem, batedura, mudanças de pH) favorece-se a formação de derivados de clorofila com diferentes cores. Quanto aos carotenoides, vários são os encontrados no azeite, mas os principais são o β -caroteno e a luteína (amarelos laranja), porém, com o processamento da azeitona, a perda da compartimentação celular pode promover a isomerização ou a degradação de carotenoides, ainda mais devido a processos de oxidação (PASQUALONE et al., 2012).

Nas azeitonas de cor roxo-escuro, o pigmento relacionado a essa tonalidade são os fenólicos chamados antocianinas, que se acumulam durante o período de maturação para proteger o material genético da exposição à luz solar e também os lipídios da oxidação. Mas, por serem polares, muito pouco encontra-se no azeite, ficando, então, retido no resíduo e sendo responsável pela coloração escura. Estes compostos, juntamente com outros fenólicos, irão contribuir também para o sabor do azeite (amargo, picante e pungente) e, certamente, contribuirá para o do bagaço (PASQUALONE et al., 2012).

2.2.3.5 Os ácidos orgânicos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

Nas azeitonas, o teor e os tipos de ácidos orgânicos encontrados variam conforme a cultivar, o estágio de maturação e o processamento das azeitonas, o que gera alterações também no resíduo. Alguns autores evidenciam que a quantidade desses ácidos pode sofrer interferência, ainda, da área de cultivo, do tempo de colheita e do ano da safra. Em geral, um perfil comum de quatro constituintes é encontrado nas azeitonas: ácidos oxálico, cítrico, málico e succínico, sendo o ácido cítrico o de maior concentração.

Os ácidos málico e cítrico são descritos como os responsáveis por influenciar a cor da azeitona (ERGÖNÜLL; NERGIZ, 2010), além de se comportarem como antioxidantes, assim como os ácidos, oxálico, tartárico, succínico e hidroxiglutárico, por possuírem a capacidade de quelar metais oxidantes. Por conseguinte, considera-se o ácido oxálico um composto antinutricional, por formar sais insolúveis com alguns cátions divalentes, como o cálcio, o que produz uma diminuição na biodisponibilidade desses minerais (ARSLAN; OZCAN, 2011).

2.2.3.6 Compostos inorgânicos do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

As azeitonas apresentam grande variedade de minerais em sua constituição e os valores têm interferência do solo, do uso de fertilizantes ou contaminantes ambientais e da contaminação durante o processamento e a armazenagem.

A identificação de certos elementos é um importante fator de qualidade do azeite, já que muitos autores descrevem os efeitos deletérios que certos

oligoelementos, como Fe, Cu, Mn e Ni, têm no sabor e na estabilidade oxidativa dos azeites, com um efeito catalítico sobre o mecanismo de auto-oxidação (CABRERA-VIQUE; BOUZAS; OLIVERAS-LÓPEZ, 2012). O mesmo pode acontecer com o resíduo.

Os níveis dos metais tóxicos Cd e Pb também são importantes sinalizadores da qualidade do azeite, principalmente no que se refere ao aspecto toxicológico. Por isso, o Codex Alimentarius especifica, para o chumbo, um limite superior para azeitonas de mesa de, no máximo, 1 mg/kg e a ingestão diária estabelecida pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM) é de 0,21 mg/kg para este elemento (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012).

Já o IOC (2011) estabeleceu, como critério de qualidade, o nível máximo de resíduos (MLR) para o conteúdo de vários metais tanto nos azeites como nos óleos de bagaço de azeitona, sendo 0,1 mg/g para As, Cu e Pb, e 3 mg/g para Fe (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2012).

No bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva obtido pelo sistema de duas fases, geralmente, o mineral que se encontra em maior concentração é o K e, em concentrações menores, o Fe, o Cu e os metais pesados, porém, existem grandes variações (INAREJOS-GARCÍA; FREGAPANE, 2011).

2.2.4 Funcionalidade dos constituintes do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

Haja vista a sua constituição, evidencia-se o que, já há algum tempo, vem sendo discutido e pesquisado, os benefícios do azeite de oliva para a saúde humana, como no caso dos países do Mediterrâneo, onde a azeitona e seus derivados compõem importante parte da dieta. De fato, crescente número de

estudos epidemiológicos e experimentais informa que o azeite de oliva pode ter um papel na prevenção de doenças cardíacas coronarianas, no comprometimento cognitivo da doença de Alzheimer, além de efeito protetor contra câncer de cólon, mama e ovário, diabetes acompanhado por hipertriacilgliceridemia e doenças inflamatórias e autoimunes, tais como artrite reumatoide. Também tem sido verificada a redução da oxidabilidade da LDL-c no estágio pós-prandial. Esses efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos ao perfil lipídico, alto em ácidos graxos monoinsaturados e baixos em saturados e, mais amplamente documentado, aos compostos fenólicos, usualmente agrupados sob a rubrica “polifenóis” (GÓMEZ-GONZÁLEZ; RUIZ-JIMÉNEZ; CASTRO, 2010).

Rodríguez et al. (2009) destacam que o consumo de azeitonas e azeite de oliva tem sido associado a benefícios à saúde, principalmente na redução de incidência de doenças cardíacas e de certos tipos de câncer e que tais benefícios estão relacionados com a baixa taxa saturados/monoinsaturados e à presença nesses alimentos de compostos antioxidantes, sobretudo os fenólicos.

Na primeira conferência internacional sobre azeites e óleos realizada, em Jaén, na Espanha, em 2004, foram destacados os benefícios do azeite de oliva sobre o perfil lipídico. Alguns dados revelam que o efeito do consumo de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) na redução do LDL-c foi menor, mas elevou o colesterol da HDL em relação aos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS). Os resultados de uma meta-análise de 14 estudos mostraram que a substituição de ácidos graxos saturados (SFA) por óleos enriquecidos em MUFA *versus* PUFA tinha efeitos similares sobre o colesterol total, o LDL-c e o HDL-c. Em alguns estudos, os óleos enriquecidos com PUFA tiveram um leve efeito na redução dos triacilgliceróis (TAG) e um aumento do HDL-c foi evidenciado com o consumo de MUFA. Dados mais recentes confirmam o aumento do HDL-c com o consumo do azeite dentro e fora da dieta do Mediterrâneo. Tanto uma dieta rica em gordura (40% da energia), rica em MUFA e baixa em SFA, e uma com baixo

teor de gordura e rica em carboidratos foram similares para baixar o colesterol, Porém, a dieta rica em MUFA não reduziu o HDL-c ou aumentou TAG, como evidenciado com a dieta rica em CHO (COVAS; KONSTANTINIDOU; FITÓ, 2009).

Em alguns estudos considera-se que a substituição de SFA por MUFA é um importante fator para a redução da LDL-c, de forma semelhante à substituição por PUFA (XAVIER et al., 2013), e que dietas contendo MUFA em substituição ao PUFA tornam a LDL menos suscetível à oxidação, o que pode resultar, em teoria, em inibição do processo aterogênico, já que é amplamente aceito que a molécula de LDL-c oxidada tem relevante papel na inflamação vascular, na disfunção do endotélio e na formação de células espumosas na parede intimal (COVAS; KONSTANTINIDOU; FITÓ, 2009). Também revelam que esses ácidos graxos alteram a composição e o metabolismo das VLDLs, diminuindo os níveis plasmáticos de TAG, além de propiciar aumento da lipase lipoproteica e da lipase hepática.

Além disso, algumas pesquisas corroboram a hipótese de que o consumo de MUFA pode exercer efeitos benéficos sobre a resistência à insulina, o aumento da resposta de produção de incretinas (aumento de GLP-1) e a redução do *clearance* de insulina em diabéticos tipo II. Contudo, não existem estudos randomizados controlados de longo prazo em relação à qualidade das gorduras dietéticas e ao risco de desenvolver diabetes. Também mencionam tais pesquisas que modificações nas proporções das gorduras, com redução de SFA e aumento de MUFA, podem colaborar para uma redução da pressão arterial. No entanto, esse efeito benéfico pode ser anulado se a gordura total consumida for excessiva.

Portanto, esforços têm sido feitos pelas indústrias de alimentos, a fim de se reduzir a quantidade de ácidos graxos saturados em seus produtos, obtendo um perfil lipídico mais favorável à saúde humana. Uma das alternativas pode ser a introdução de resíduos agroindustriais, como verificado por Vera et al. (2009)

que, avaliando a qualidade da carcaça, com seu perfil de ácidos graxos, de cordeiros alimentados com o bagaço de azeitona obtido da extração do azeite de oliva, verificaram que os animais alimentados com a dieta contendo esse bagaço modificaram o perfil dos ácidos graxos encontrados em sua gordura subcutânea, com redução dos ácidos graxos saturados e aumento dos monoinsaturados. Constataram também aumento dos ácidos oleico e esterárico e redução do ácido palmítico. Isto indica melhora nos índices arterogênicos e trombogênicos dos consumidores desse tipo de carne.

Assim, em estudos epidemiológicos tem sido sugerido que dietas ricas em $\omega 3$ e $\omega 9$ têm relação inversa com DCV, por causar redução de TAG e da razão LDL/HDL no sangue, quando fornecidos em substituição aos AGS. Contudo, deve-se ter cautela com a quantidade ingerida, já que o consumo de grandes doses, tanto de óleos como de gorduras, pode gerar a lipemia pós-prandial, que acarreta o estresse oxidativo responsável por danos ao endotélio vascular. No entanto, tem sido observado que o azeite de oliva, mesmo sendo ingerido em doses em que o estresse oxidativo ocorre ($>40\text{mL/d}$), tem reduzido este estresse, em virtude da presença dos compostos fenólicos. E isso ocorre na ordem dose-dependente, ou seja, azeites com um alto conteúdo de compostos fenólicos alteram o perfil pós-prandial hemostático para um estado menos trombogênico, em comparação com um azeite de oliva com baixo teor de fenólicos (COVAS; KONSTANTINIDOU; FITÓ, 2009).

Assim, o reconhecimento do valor dos compostos fenólicos do azeite de oliva virgem se deve ao seu poder antioxidante, ou seja, à sua habilidade para inibir reações oxidativas que estão envolvidas no início e na progressão de certas doenças humanas (CIOFFI et al., 2010), incluindo aterosclerose, câncer, *diabetes mellitus* e doenças inflamatórias e neurodegenerativas. Além disso, esses compostos previnem a deterioração de alimentos por inibir a oxidação lipídica (RODRÍGUEZ et al., 2008).

Essa capacidade antioxidante pode variar de moderada à fraca, dependendo das características estruturais dos compostos fenólicos presentes no azeite. Tal como esperado, os compostos com a presença de um radical 3,4-dihidroxi ligado a um anel aromático são mais ativos do que aqueles com apenas um grupo hidroxila, sendo que a glicosilação reduz a atividade antioxidante. Segundo Cornwell e Ma (2008), os compostos fenólicos do azeite são antioxidantes mais fortes do que o ácido ascórbico ou α -tocoferol. Então, isso sugere que o azeite de oliva virgem poderia exercer um efeito protetor contra as patologias cuja etiologia tem sido relacionada às injúrias mediadas pelos metabólitos reativos de oxigênio. Cioffi et al. (2010) não encontraram diferença significativa na atividade antioxidante entre o azeite virgem, o azeite obtido do bagaço da azeitona e o das folhas da oliva.

No azeite encontra-se uma mistura complexa de compostos fenólicos já que, devido a algumas variáveis, como grau de amadurecimento, processamento e armazenamento, podem sofrer transformações que implicam em aumento ou redução de certos compostos e assim também na atividade antioxidante. Como exemplo, tem-se a acidez, que provoca hidrólise na estrutura da oleuropeína formando hitroxitirosol (Ht). Assim também ocorre com os ligstrosídeos que são hidrolisados formando tirosol (Ty) (CORNWELL; MA, 2008). Assim, parte dos fenólicos do azeite é de ligstrosídeo agliconas e Ty, os quais são monofenóis com pouca ou nenhuma atividade antioxidante. Então, dependendo da quantidade diária de azeite ingerida, a ingestão de fenóis (difenois- Ht) com capacidade antioxidante acaba sendo mínima (SAURA-CALIXTO; GONI, 2006). Segundo Cornwell e Ma (2008), o Ht, assim como um extraordinário número de compostos naturais de origem das plantas, regula a cascata ácido araquidônico (AA)/leucotrienos (LT), inibindo a 5-LOX catecol e a prostaglandina (PG) E2, atuando como anti-inflamatório.

Contudo, após o processamento da oliva para a obtenção do óleo, constata-se que somente 1% dos compostos fenólicos é encontrado no azeite, ficando o restante localizado nos resíduos gerados na extração do azeite os líquidos e sólidos. Conseqüentemente, tais resíduos poderiam ser considerados fontes promissoras desses componentes. Hidroxitirosol, 2-(3,4-di-hidroxifenil) etanol (Ht), é um dos principais e mais interessantes compostos fenólicos presentes na oliva, o qual é conhecido pelo alto nível de atividade antioxidante. Esse composto pode ser achado no resíduo na forma livre, de monômeros ou como oleuropeína, acteosídeo ou glucosídeo. Outro fenol encontrado nos resíduos é o 3,4-di-hidroxifenilglicol (DHPG) (RODRÍGUEZ et al., 2009). Segundo Alúdtatt et al. (2010), o azeite de oliva contém 2% do total do conteúdo fenólico das azeitonas inteiras, enquanto os remanescentes 98% estão presentes no resíduo. Assim, acredita-se que seu potencial bioativo, antioxidante e terapêutico (anticancerígeno, antiviral, anti-inflamatório, hipolipidêmico e hipoglicêmico) seja superior ao do azeite. Assim como no azeite, a constituição e a concentração desses compostos dependerão de vários fatores, como cultivar e maturidade do fruto, condições climáticas, tempo de armazenamento e técnica de processamento.

Alúdtatt et al. (2010), ao avaliarem as condições de extração e atividade antioxidante de compostos fenólicos do bagaço de azeitonas, observaram correlação positiva entre o conteúdo total de fenólicos e a atividade antioxidante e confirmaram que o resíduo sólido constitui uma fonte natural e de baixo custo de compostos fenólicos com atividade antioxidante que pode ser usada em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e alimentos funcionais. Sendo assim, o uso do resíduo, em tais produtos, além de reduzir o impacto da produção do azeite de oliva no meio ambiente, poderá trazer benefícios à saúde humana.

No entanto, no que se refere aos benefícios à saúde humana, entende-se que o efeito potencial de componentes dos alimentos é dependente do seu

comportamento no trato digestório, ou seja, eles precisam ser biodisponíveis, sob alguma forma, para exercer seus efeitos biológicos. Assim, Kountouri et al. (2007) efetuaram a investigação de compostos fenólicos no plasma e na urina de voluntários saudáveis, após a ingestão de azeitonas e concluíram que o consumo de azeitonas leva a um aumento dos compostos fenólicos no plasma e do potencial antioxidante, ou seja, constataram que os compostos fenólicos são extensivamente metabolizados pelo organismo humano e aparecem nos fluidos biológicos, principalmente na forma de glucoronídeos (conjugados com ácido glicurônico). Dos quinze compostos fenólicos detectados nas azeitonas, sete (Ty, Ht e seus possíveis metabólitos) estavam aumentados nos fluidos biológicos.

Estudos em sistemas *in vitro* têm obtido resultados positivos quanto o papel antioxidante desses componentes fenólicos do azeite, como a eficiência dos derivados da oleuropeína e alguns flavonoides sobre o aumento da resistência da oxidação da LDL-c e, assim, redução do risco de aterogênese.

Leen et al. (2002), em estudo *in vitro* incubando, em plasma, fenóis do óleo de oliva, demonstraram que eles aumentam a resistência da LDL-c à oxidação. Estes autores constataram que o orthodi-hidroxiphenol e a oleuropeína-aglicona foram mais eficientes que os homólogos mono-hidroxi na proteção da LDL-c. A habilidade dos fenóis em participar da LDL-c é esperada ser um relevante fator para a eficácia antioxidante. Fenóis glicosilados, tal como oleuropeína-glicosídeo são muito hidrofílicas e somente aumentam marginalmente a resistência da LDL-c, enquanto uma mistura rica em homólogos agliconas mostra maior atividade antioxidante.

Já em sistemas *in vivo*, o primeiro requisito para que um composto alimentar seja um potencial antioxidante é que ele entre na circulação sanguínea. Os estudos em animais e humanos mostram que fenóis do azeite são bem absorvidos. A absorção é confirmada pela recuperação de Ty e Ht na urina após a ingestão de fenóis do azeite de oliva. Um outro requisito para proteção contra

modificações oxidativas da LDL-c é que o composto ingerido se torne disponível no plasma ou na LDL-c, numa forma com capacidade antioxidante, porque a atividade antioxidante original de um composto absorvido pode ser alterada (VISSERS; ZOCK; KATAN, 2004).

Esses fenóis podem estar presentes no plasma, principalmente sob a forma glucuronados e O-metilado, ou seja, conjugados. Dados confiáveis sobre a concentração plasmática de fenóis de azeite de oliva são escassos. Resultados de estudos em seres humanos com vários marcadores de oxidação são inconsistentes com a maioria dos estudos, mostrando nenhum efeito desses fenólicos. Já em animais, os estudos sugerem efeito dos fenóis na capacidade antioxidante. Algumas pesquisas informam que a quantidade de fenóis requerida para proteger a oxidação da LDL no plasma é muito maior (50-100 $\mu\text{mol/l}$) do que estará disponível com uma ingestão de alta dose de azeite de oliva extravirgem (0,06 $\mu\text{Mol/l}$). Esse valor refere-se a uma ingestão de 2 mg de equivalente de Ht, considerando uma absorção de 66%. Além disso, tirosol e hidroxitirosol são polares e não se dissolvem facilmente em partículas de LDL-c, *in vivo*, mas podem ligar-se frouxamente na superfície da partícula. Já os fenóis lipofílicos acumulam dentro da partícula da LDL-c. Por tais características, acredita-se que os fenóis do azeite, por si só, não sejam capazes de proteger a LDL-c contra a oxidação, mas que atuam em conjunto com outros antioxidantes abundantes na dieta do Mediterrâneo e/ou têm efeitos benéficos fora da LDL, tais como na melhoria da função endotelial e na inibição da agregação plaquetária (VISSERS; ZOCK; KATAN, 2004).

Portanto, é difícil estimar o efeito antioxidante pela ingestão de antioxidantes, já que esse potencial depende do tipo de compostos fenólicos (com diferentes atividades antioxidantes) e da biodisponibilidade deles no organismo humano, de forma isolada e na dieta diária (VISSERS; ZOCK; KATAN, 2004).

Um conjunto de estudos informa a presença de inibidores do fator ativador de plaquetas (PAF) nas frações lipídicas polares de subprodutos do óleo de oliva, incluindo o resíduo líquido (água de vegetação), bem como extrato lipídico polares do azeite de oliva e bagaço. O PAF é um potente mediador lipídico, sintetizado por diferentes tipos celulares após ativação, como plaquetas, monócitos, macrófagos, células espumosas e células endoteliais. Tem sido implicado na propagação da resposta inflamatória, por isso sugere-se que é a molécula chave nas doenças inflamatórias, tal como aterosclerose. Os agonistas do PAF são considerados seus melhores inibidores. Tais moléculas atuam por meio dos receptores do PAF, inibindo sua ação biológica em baixas concentrações enquanto induzem a agregação plaquetária em significativamente concentrações mais elevadas. Stamatakis et al. (2009), ao investigarem a presença de inibidores do PAF nas frações lipídicas totais e polares do resíduo líquido do beneficiamento do azeite de oliva, verificaram que todas as amostras apresentaram atividade inibitória do PAF, ou seja, inibiram a atividade plaquetária induzida pelo PAF. Os autores constataram que a maioria das frações dos lipídios polares inibiu a atividade plaquetária induzida pelo PAF e que o restante apresentou dupla atividade, a de inibir o PAF em baixa concentração e a de ser agonista do PAF em alta concentração. Também constataram que, em algumas frações, a atividade antioxidante se correlaciona com o seu conteúdo de compostos fenólicos, mas não com a atividade anti-PAF.

REFERÊNCIAS

- ALÚDATT, M. H. et al. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. **Food Chemistry**, London, v. 123, n. 1, p. 117-122, Nov. 2010.
- ARJONA, R.; GARCÓA, A.; OLLERO, P. The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 41, n. 3/4, p. 229-234, Aug./Sept. 1999.
- ARSLAN, D.; OZCAN, M. M. Influence of growing area and harvest date on the organic acid composition of olive fruits from Gemlik variety. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 633-641, Sept. 2011.
- BORJA, R. F. R.; RINCÓN, B. Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 57, n. 1, p. 32-46, ene./mar. 2006.
- BOSKOU, D. Olive oil. mediterranean diets. **Word Review of Nutrition and Diet**, Basel, v. 87, n. 1, p. 56-77, May 2000.
- CABRERA, A. et al. Estudio del efecto de la adición de alperujo sobre la persistencia de diuron en el cultivo del olivar. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 33, n. 1, p. 209-216, 2010.
- CABRERA-VIQUE, C.; BOUZAS, P. R.; OLIVERAS-LÓPEZ, M. J. Determination of trace elements in extra virgin olive oils: a pilot study on the geographical characterisation. **Food Chemistry**, London, v. 134, n. 1, p. 434-439, Sept. 2012.
- CARDOSO, L. G. V. **Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas em Minas Gerais, Brasil**. 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CIOFFI, G. et al. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, London, v. 121, n. 1, p. 105-111, July 2010.

CENTRE D'INITIATIVE POUR LA PRODUCTION PROPRE. **Prévention de la pollution dans la production d'huile d'olive**. Barcelona, 2000. Disponível em: <http://www.cema-sa.org/files/mcsd/fr/oli_fr.pdf>. Acesso em: 20 set. 2012.

CORNWELL, D. G.; MA, J. Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 19, p. 8774-8786, Sept. 2008.

COVAS, M. I.; KONSTANTINIDOU, V.; FITÓ, M. Olive oil and cardiovascular health. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, v. 54, n. 6, p. 477-482, Dec. 2009.

DEJONG, S.; LANARI, M. C. Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. **Food Chemistry**, London, v. 116, n. 4, p. 892-897, Oct. 2009.

ERGÖNÜLL, P. G.; NERGİZ, C. Determination of organic acids in olive fruit by HPLC. **Czech Journal Food Science**, Praha, v. 28, n. 3, p. 202-220, 2010.

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. et al. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: isolation of added-value compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 19, p. 5849-5855, Aug. 2004.

GACHONS, C. P. des et al. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. **The Journal of Neuroscience**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 999-1009, Jan. 2011.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatbals. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 7, p. 1018-1025, Sept. 2010a.

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 7, p. 1009-1017, Sept. 2010b.

GALLARDO-GUERRERO, L.; ROCA, M.; MOSQUERA, M. I. M. Distribution of chlorophylls and carotenoids in ripening olives and between oil and alperujo when processed using a two-phase extraction system. **JAOCS**, West Lafayette, v. 79, n. 1, p. 105-109, Jan. 2002.

GARCÍA, A. et al. Debittering of olives by polyphenol oxidatio. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 24, p. 11862-11867, Dec. 2008.

GÓMEZ-GONZÁLEZ, S.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; CASTRO, M. D. L. de. Fatty acid profiling of the main tissues of spanish olive fruit: effect of the oil extraction method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 87, n. 12, p. 1413-1423, Dec. 2010.

INAREJOS-GARCÍA, A. M. et al. PDO virgin olive oil quality-minor components and organoleptic evaluation. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 8, p. 2138-2146, Oct. 2010.

INAREJOS-GARCÍA, A. M.; FREGAPANE, G. Efect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor componentes. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 232, n. 3, p. 441-451, Mar. 2011.

INTERNATIONAL OLIVE OIL. **Pesquisa:** produção de óleo de oliva. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

KOUNTOURI, A. M. et al. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, n. 10, p. 659-667, Oct. 2007.

LAFKA, T. I. et al. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. **Food Chemistry**, London, v. 12, n. 1, p. 92-98, Mar. 2011.

LEENEN, R. et al. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 5, p. 1290-1297, Jan. 2002.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. et al. Analysis of the legislated metals in different categories of olive and olive-pomace oils. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 221-225, Feb. 2012.

LOPES, C. B. et al. Biotecnologia e bioconversão de resíduos agro-industriais: uma revisão. In: SEMANA DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS, 6., 2008, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: UTFPR, 2008. 1 CD-ROM.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C.; BENASSI, V. de T. **Óleos:** alimentos funcionais. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 91 p.

MARKET of olive residues for energy. Disponível em:
<http://www.moreintelligentenergy.eu/public/file/download/D4_2%20ES.pdf>.
Acesso em: 25 jul. 2012.

MATOS, A. T. de. **Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais.** Viçosa, MG: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 2005. Disponível em:
<<http://www.ufv.br/dec/simea/apresentacoes/CursoMatosFEAM2005.pdf>>.
Acesso em: 22 mar. 2011.

MENZ, G.; VRIESEKOOOP, F. Physical and chemical changes during the maturation of gordal sevilla olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 8, p. 4934-4938, Mar. 2010.

OBIED, H. K. et al. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 1238-1248, July 2007.

PASQUALONE, A. et al. Characterization of virgin olive oil from Leucocarpa cultivar by chemical and DNA analysis. **Food Research International**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 188-193, July 2012.

RODRÍGUEZ, G. et al. Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of Alperujo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 1, p. 136-142, Dec. 2007.

RODRÍGUEZ, G. et al. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 42, n. 2, p. 483-490, Mar. 2009.

RODRÍGUEZ, G. et al. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 13, p. 5261-5269, Sept. 2008.

SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 6, p. 442-447, Feb. 2006.

SILIANI, S. et al. Bitter taste and phenolic compounds in extra virgin olive oil: an empirical relationship. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 29, n. 4, p. 431-441, Aug. 2006.

STAMATAKIS, G. et al. Detection and isolation of antiatherogenic and antioxidant substances present in olive mill wastes by a novel filtration system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 22, p. 10554-10564, Oct. 2009.

SÚAREZ, M. et al. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 4, p. 1463-1472, Jan. 2009.

UCEDA, M. et al. Elaboração de azeite de oliva de qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 231, p. 90-96, mar./abr. 2006.

VERA, R. et al. Feeding dry olive cake modifies subcutaneous fat composition in lambs, noting cake resistance to degradation and peroxidation. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 69, n. 4, p. 548-559, Oct./Dec. 2009.

VISSERS, M. N.; ZOCK, P. L.; KATAN, M. B. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 58, n. 6, p. 955-965, June 2004.

XAVIER, H. T. et al. V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 4, p. 1-36, out. 2013. Suplemento 1.

CAPÍTULO 2

Caracterização química e atividade antioxidante *in vitro* da farinha do bagaço de azeitona obtido da extração do azeite de oliva

RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, testar diferentes tratamentos na redução de parte dos compostos fenólicos do bagaço de azeitonas oriundo da extração do azeite de oliva, para a obtenção de diferentes farinhas e a posterior caracterização química das mesmas e análise da atividade antioxidante *in vitro*. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, totalizando 6 tratamentos: bagaço bruto submetido à secagem em estufa (55 °C/24horas), bagaço bruto sem tratamento, bagaço em água à temperatura de 25 °C, bagaço em água quente (90 °C), bagaço em água à temperatura de 25 °C com NaCl 1%, bagaço em água à temperatura de 25 °C com NaCl 2%, todas na proporção de 1:1p/v e, posteriormente, deixadas à temperatura ambiente por 24 horas. Todas as amostras foram liofilizadas e trituradas, com a obtenção das farinhas. A caracterização química foi efetuada pelas análises da composição centesimal, fibra alimentar, minerais, perfil de ácidos graxos e dos ácidos orgânicos, fenólicos totais e a atividade antioxidante, usando três sistemas; β -caroteno/ácido linoleico, DPPH e ABTS. Evidenciaram-se, nas farinhas, alto teor de lipídio (12%) e baixo em proteína, que não diferiram entre os tratamentos ($p>0,05$) e uma quantidade apreciável de fibra alimentar, com destaque para a insolúvel em maior concentração na farinha obtida do resíduo tratado com água quente não diferindo dos tratamentos em estufa e com água em temperatura ambiente. Em todas as amostras, os principais ácidos graxos detectados foram o palmítico, o linoleico e o oleico, sendo este último em maior concentração. Todas as farinhas tinham teores elevados para o mineral potássio, porém, a de menor valor foi a do resíduo tratado com água quente. A maior parte dos minerais foi encontrada na farinha obtida do bagaço bruto, sugerindo que o uso de soluções promove uma redução nesses compostos. Quanto aos níveis do metal tóxico Pb, evidenciam-se, nas farinhas, valores menores que 1 mg/kg. Os tratamentos empregados interferiram na extração dos ácidos orgânicos. O ácido oxálico foi o único encontrado em todas as amostras, sendo em maior concentração na farinha em que se utilizou o NaCl 2% e a menor para o bagaço bruto. O emprego do tratamento térmico conduziu em perda dos ácidos orgânicos, tartárico, cítrico e málico. Verificou-se que todas as farinhas têm concentração elevada de fenólicos totais, porém, quando o resíduo foi submetido

aos tratamentos, a concentração desses compostos reduziu-se significativamente, não diferindo entre os mesmos. Isso sugere diminuição de pelo menos parte do amargor advindo desses compostos. Por outro lado, evidencia-se que, com os tratamentos aplicados, há uma queda na atividade antioxidante total *in vitro* avaliada pelos três sistemas, porém, não em uma mesma proporção. Dentre os testes utilizados, o emprego da água em temperatura ambiente (23 °C) seria uma melhor opção para tratar o resíduo anteriormente ao uso.

Palavras-chave: Resíduo do azeite de oliva. Análises químicas. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The objective of this study was to test different treatments in reduction of the phenolic compounds of olive pomace coming from the extraction of olive oil to obtain different flours and further chemical characterization and analysis of antioxidant activity *in vitro*. It was used a completely randomized design (CRD) with three repetitions, totaling 6 treatments: raw residue subjected to oven drying (55 °C/24 hours), raw residue without treatment, residue in water at temperature 25 °C, residue in hot water (90 °C), residue in water at temperature 25 °C with NaCl 1%, residue in water at temperature 25 °C with NaCl 2%, all at the proportion of 1:1p/v, then left at ambient temperature for 24 hours. All samples were lyophilized and ground to obtain of the flour. Chemical characterization was performed by the analysis of chemical composition, dietary fiber, minerals, fatty acid profile and organic acids, phenolic and antioxidant activity using three systems; β -carotene/linoleic acid DPPH and ABTS. It was evident, in the flour, high lipid content (12%) and low in protein, which did not differ among the treatments ($p>0.05$). An appreciable amount of dietary fiber, especially the insoluble in higher concentrations in the flour obtained from treated residue with hot water did not differ from treatments in greenhouse and with water at ambient temperature. In all samples the major fatty acids detected were palmitic, linoleic and oleic, the latter being in greater concentration. All the flours had higher levels for the mineral potassium, but the lowest value was the residue treated with hot water. Most minerals found in the flour obtained from raw residue suggesting that the use of solutions promotes a reduction in these compounds. As regards toxic metal Pb levels are evident in the flours values less than 1 mg/kg. The treatments interfered in the organic acids extraction. Oxalic acid was the only one found in all samples, with the highest concentration in the flour that was used the NaCl 2% and lower for the raw residue. The heat treatment use resulted in loss of organic acids, tartaric, citric and malic. It was found that all flours have high concentration of total phenolics, but when the residue was subjected to treatment the concentration of these compounds significantly reduced, did not differ among them. This suggests reduction at least some of the bitterness arising of these compounds. Moreover, it is evident that with the applied treatments, there is a decrease in the total antioxidant activity *in vitro* evaluated by the three systems, but not in the same proportion. Among the tests used, the water use at ambient temperature (23 °C) would be a better option to treat the residue prior to use.

Keywords: Olive oil residue. Chemical analysis. Antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das culturas de maior importância da região do Mediterrâneo. O seu fruto, a azeitona, é empregado, além de outros, na produção de azeite, cuja utilização se encontra em plena expansão mundial, incluindo o Brasil. O azeite é reconhecido pelos seus sabores e aromas, e, quando habitualmente consumido, apresenta benefícios à saúde humana, pela ação dos ácidos graxos monoinsaturados e seus compostos fenólicos.

No processo de produção do azeite de oliva pelo sistema de centrifugação de duas fases é gerada uma quantidade significativa de bagaço, massa semipastosa com polpa e caroços de azeitonas e que é responsável por sérios problemas ambientais, em consequência de seu inadequado descarte. Vários estudos têm sido realizados evidenciando as características físico-químicas desses resíduos, visando à sua utilização na extração do azeite residual, em ração animal, em adubo, em herbicida ou em pesticida (CABRERA et al., 2010), na extração de componentes orgânicos (pectina, antioxidantes e enzimas), como substrato para a obtenção de álcoois, biossurfactantes, biopolímeros, carvão ativado, além da produção de energia (MARKET..., 2008).

Apesar de vários pesquisadores considerarem o resíduo da extração do azeite de oliva uma fonte natural e de baixo custo de uma série de importantes compostos, como os fenólicos, pela ação antioxidante, tais resíduos não têm tido aplicabilidade na indústria de alimentos. O que tem sido feito é a criação de novas técnicas de extração para o isolamento dessas substâncias, já que é crescente o interesse pelos antioxidantes naturais, uma vez que os artificiais têm sido relacionados com efeitos indesejáveis à saúde humana.

Mas, mesmo frente às várias características químicas encontradas nesses resíduos e às pesquisas da funcionalidade de alguns de seus componentes, poucos são os estudos que relacionam o uso desse resíduo na forma de farinha

para produtos alimentícios de consumo humano. Isso pode estar relacionado ao amargor, característico das azeitonas, pela presença de alguns compostos fenólicos, como a oleuropeína e seus derivados, e também ao aspecto visual do resíduo. E, como a afinidade desses compostos é maior pela água por serem de natureza mais polar, são encontrados em maior concentração no resíduo que no azeite e, assim, as características sensoriais ficarão mais evidentes no resíduo (GÓMEZ-GONZÁLEZ; RUIZ-JIMÉNEZ; CASTRO, 2010).

No processo de fabricação das azeitonas de mesa, os compostos fenólicos são, pelo menos em parte, removidos de forma a minimizar o sabor amargo característico do fruto cru e isso é feito utilizando-se o meio alcalino com NaOH e/ou salmoura que irá propiciar a hidrólise e a diluição desses compostos no meio que, com o processo de lavagem, serão, em parte, descartados (NYCHAS et al., 2002; PANAGOU et al., 2008). Já a coloração escura do resíduo tem sido relacionada com a presença de outro composto fenólico, as antocianinas, que se acumulam no fruto durante o período de maturação, na pele e na polpa, mas que também apresentam natureza polar (PASQUALONE et al., 2012). Portanto, uma das formas de se tratar o resíduo de maneira a reduzir tais características indesejáveis é o emprego da água visando à solubilização desses compostos.

Diante do exposto, objetivou-se, com este estudo, testar diferentes tratamentos na redução de parte dos compostos fenólicos do resíduo da extração do azeite de oliva para a obtenção, a caracterização química e a atividade antioxidante *in vitro* de diferentes farinhas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

A amostra do resíduo foi obtida, em março de 2011, do processamento da oliva 'Arbequina', pelo sistema de duas fases, realizado na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), na região sul de Minas Gerais. O bagaço de azeitonas foi colhido imediatamente após a extração do azeite e armazenado em embalagens de polietileno e congelado, a -40 °C, para posterior utilização nas análises.

2.2 Tratamento da amostra e obtenção das farinhas do bagaço de azeitonas oriundo da extração do azeite de oliva

Na tentativa de eliminar parte das substâncias responsáveis pelo amargor característico da oliva utilizada na extração do azeite e, assim, presente em grande concentração no bagaço de azeitonas, foram efetuados testes utilizando, a princípio, a metodologia empregada pelas indústrias na manufatura de azeitonas em conserva, com algumas modificações, segundo Aquarone et al. (2001). Assim, testou-se a salmoura, porém, com concentrações menores de NaCl, 1% e 2%, e também soluções com o emprego de água potável a 25 °C e em temperatura em torno de 90 °C.

O resíduo bruto foi imerso nas soluções supracitadas na relação bagaço de azeitonas:solução de 1:1 p/v e deixado em temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, foi filtrado usando uma peneira de ABNT 20 com descarte da água e, depois, submetido ao processo de liofilização (L108, Lio top), para desidratação. Uma amostra do bagaço de azeitonas bruto foi testada quanto ao processo de secagem, em estufa, a 55 °C, por 24 horas. Para a obtenção das

farinhas (Figura.1), os bagaços de azeitonas tratados, o bruto liofilizado e o submetido à estufa, foram triturados em moinho Tecnal TE 631/2. Obtiveram-se, então, seis amostras que foram utilizadas nas análises posteriores.

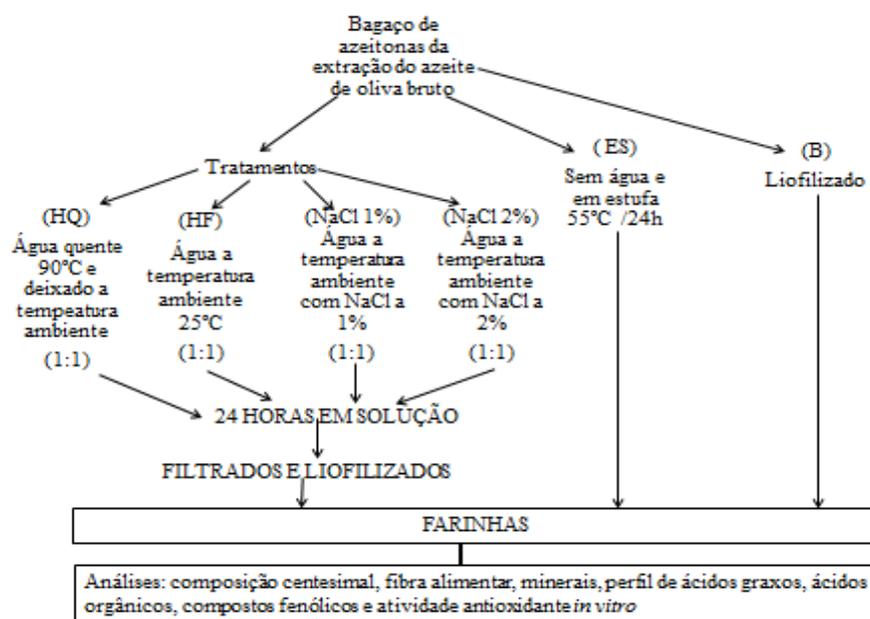


Figura1 Fluxograma de obtenção das seis farinhas do bagaço de azeitonas oriundo da extração do azeite de oliva

2.3 Composição centesimal com análise da fibra alimentar

A composição centesimal das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva foi realizada conforme Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990). Para a fibra alimentar total, solúvel e insolúvel das farinhas, utilizou-se o método enzimático-gravimétrico descrito pela AOAC (2000). O extrato não nitrogenado (ENN) foi obtido por diferença. Os resultados foram expressos em porcentagem de matéria seca.

2.4 Determinação de minerais das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva

Os teores de cálcio, enxofre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio e sódio foram determinados de acordo com Fick e Green (1980). Foi pesado 1,0 g do resíduo seco e adicionados 10 mL de solução nitroperclórica na razão 3:1(p/v), colocada em bloco digestor e mantida a digestão até a formação de uma solução límpida. Em seguida, efetuaram-se leituras das absorbâncias em espectrofotômetro de absorção atômica. A concentração dos elementos foi calculada utilizando-se curva padrão. Para os elementos chumbo, cobre, cromo e zinco, empregou-se o método 3051A da United States Environmental Protection Agency - USEPA (1998). Para tanto, 0,5 g de amostra foi digerida com 5 mL de HNO₃ em forno de micro-ondas (CEM-Mars®). Transcorrido o tempo de digestão, a amostra foi filtrada e o filtrado lavado com 5 mL de água bidestilada. As alíquotas foram submetidas à determinação analítica em espectrofotômetro de absorção atômica com chama de ar-acetileno (FAAS). Para validação da metodologia, utilizou-se padrão de referência (BCR-482 Líquen) com valores certificados dos elementos de interesse. Os resultados foram expressos em mg.100 g⁻¹ da matéria seca.

2.5 Análise do perfil de ácidos graxos das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

2.5.1 Extração dos ácidos graxos

Os ácidos graxos das farinhas do resíduo da extração do azeite de oliva foram extraídos conforme Folch, Lees e Stanley (1957) e diluídos com 5 mL de clorofórmio, seguindo-se as etapas de derivação (saponificação) e de

esterificação dos ácidos graxos obtidos da extração anterior, conforme Hartman e Lago (1973).

2.5.2 Análise cromatográfica

Os extratos foram dissolvidos em 1 mL de hexano e 1 μ L dessa solução injetado em cromatógrafo a gás modelo CG – 17 A, marca Shimadzu, com detector FID (ionização de chama) e coluna AT tm silar 95 (100 m x 0,25 mm), film thickness 20 μ m. Foram injetados 1 μ L de amostra com auxílio de seringa (Hamilton®) em sistema Split=5. O gás nitrogênio foi utilizado como carreador, com velocidade linear de 37,8 cm/s e fluxo de 1,0 mL/minuto. A temperatura inicial da coluna foi de 140 °C (5 minutos), aumentando em 4 °C por minuto, até atingir 240 °C (20 minutos). Picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões metil ésteres conhecidos. Os resultados foram expressos como percentual da concentração relativa.

2.6 Determinação de ácidos orgânicos das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva por HPLC

2.6.1 Extração dos ácidos orgânicos

Três métodos de extração dos ácidos orgânicos foram testados: a) com metanol 25%, citado por Ergönül e Nergiz (2010), b) com tampão fosfato de potássio 50 mM (0,05 M) pH=7,0 na diluição (1:4), conforme Rodrigues et al. (2007) e c) extração com água destilada na diluição (1:4), deixando sob agitação em banho-maria, a 80 °C, por 30 minutos. O resultado descrito refere-se à extração com água, por ter sido mais eficiente na extração dos ácidos orgânicos no resíduo.

2.6.2 Separação e quantificação dos ácidos orgânicos por HPLC

Aparelho HPLC marca Shimadzu, equipado com bomba quaternária LC 20 AT e bomba binária LC 20 AD, forno CTO 20 A, injetor automático SIL 20 HT e coluna SCR-102H (250 mm, coluna Shim-pack x 7.8mm i.d.), conexão serial 2-colunas e pré-coluna Shim-pack SPR-H (50 mm x 7.8mm i.d.) com detector de condutividade, polaridade positiva, CDD 10AVP, fase móvel: 16 mM bis-tris solução aquosa com 4 mM ácido *p*-toluenosulfônico e 100 μ M EDTA, taxa de fluxo de 0,8 mL/min, temperatura de 40 °C; 10 μ L dos padrões individuais, concentrações conhecidas, foram injetados na coluna e seus tempos de retenção determinados para a obtenção da curva de calibração. Após a injeção das amostras, picos cromatográficos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção das amostras com os dos padrões. No cálculo dos ácidos orgânicos consideraram-se as taxas de diluição. Os resultados foram expressos em mg.100 g⁻¹ da matéria seca.

2.7 Determinação de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante *in vitro* das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva

2.7.1 Extração dos compostos fenólicos

Um grama de amostra foi diluído em 40 mL de álcool metílico 50%, homogeneizado e mantido à temperatura ambiente, protegido da luz, por 1 hora. Foi realizada centrifugação, a 23.713 g, por 17 minutos; o sobrenadante foi coletado e adicionados 40 mL de acetona 70%; em seguida, foi homogeneizado e deixado em repouso por 1 hora. Nova centrifugação foi realizada, coletou-se o sobrenadante, adicionou-se ao primeiro e completou-se o volume para 100 mL,

com água destilada. O teor de fenólicos totais foi obtido pelo método de Waterhouse (2002), empregando-se o reagente Folin-Ciocalteu e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico ($\text{mgGAE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

2.7.2 Métodos da atividade antioxidante total

2.7.2.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil, 1picril-hidrazil (DPPH).

Este método baseia-se na captura do radical estável DPPH em solução de metanol por um composto antioxidante presente na amostra, de acordo com os procedimentos de Rufino et al. (2007). Adicionou-se 0,1 mL de cada extrato das amostras a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH ($60 \mu\text{M}$). A absorvância a 515 nm foi medida após 1 hora. A capacidade de sequestro do radical foi expressa como EC50 (concentração efetiva, mg/L), o qual representa a quantidade necessária do antioxidante para reduzir a absorvância inicial em 50% e calculado a partir de uma curva de calibração por regressão linear.

2.7.2.2 Método sistema β -caroteno/ácido linoleico

Este método foi desenvolvido por Marco (1968), modificado por Miller (1971), sendo adotados os procedimentos de Rufino et al. (2006). Trata-se de um método espectrofotométrico baseado na oxidação do β -caroteno, induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. O β -caroteno (20 mg), foi dissolvido em 1 mL de clorofórmio e preparou-se uma solução-sistema: 50 μL da solução β -caroteno, 40 μL de ácido linoleico, 530 μL de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio. Evaporou-se o clorofórmio e adicionou-se água saturada com oxigênio, até a obtenção de absorvância entre 0,6 nm e 0,7 nm a 470 nm. Em 0,4 mL de cada extrato das amostras ou do antioxidante padrão (Trolox [$0,2 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$]).

1]) foram adicionados 5 mL de solução sistema e incubou-se em banho-maria, a 40 °C. Nos tempos de 2 e 120 minutos, as leituras foram realizadas, em espectrofotômetro, a 470 nm e os resultados, expressos em percentual de inibição da oxidação do β -caroteno (% I).

$$\% I = (Ac - Am).100/Ac$$

Ac = absorbância inicial do controle – absorbância final do controle

Am = absorbância inicial da amostra – absorbância final da amostra

2.7.2.3 Método do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

Este método é baseado na captura do radical livre ABTS^{•+}, sendo adotados os procedimentos propostos por Rufino et al. (2007). O Radical (ABTS^{•+}) foi produzido pela reação de 5 mL da solução estoque ABTS (7 mM) com 88 μ L da solução de persulfato de potássio (140 mM). Essa solução foi condicionada em vidro âmbar e armazenada, à temperatura ambiente, por 16 horas, antes do uso. A solução ABTS foi diluída com etanol, até uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$, a 734 nm. Foram adicionados 3,0 mL da solução do radical ABTS em cada solução de concentração da curva padrão de trolox (2 mM) e em 150 μ L de cada amostra, com realização da leitura a 734 nm. Os resultados foram expressos em μ M de trolox/grama de amostra (RUFINO et al., 2006).

2.8 Análise estatística

O estudo foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, totalizando 6 tratamentos e 18 parcelas. Os dados foram analisados utilizando o programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2000) e submetidos à análise de variância, complementada com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparação de médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção das farinhas do bagaço de azeitonas bruto e tratado

As farinhas obtidas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva, tratado e bruto, podem ser visualizadas na Figura 2.

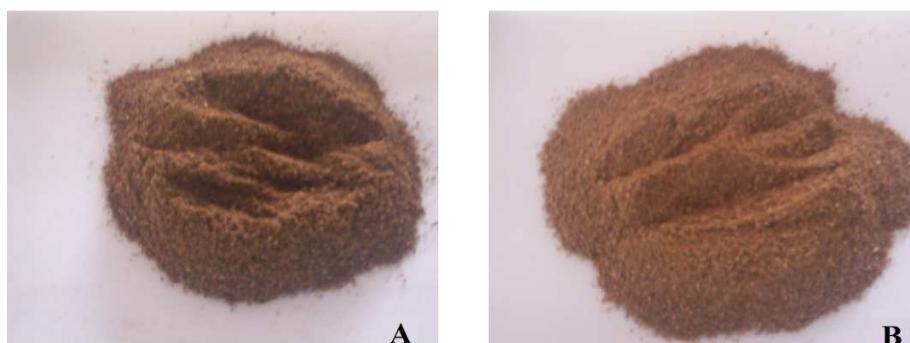


Figura 2 Ilustração das farinhas obtidas do bagaço de azeitonas bruto (A) e tratado em água à temperatura ambiente, por 24 horas (B)

Na ilustração das farinhas obtidas do resíduo da extração do azeite de oliva (Figura 2) observa-se coloração mais escura para a farinha A (no estado bruto), quando comparada a farinha tratada em solução aquosa em temperatura ambiente por 24 horas. Provavelmente, o tempo em solução contribuiu para a extração de substâncias responsáveis pela coloração do resíduo.

3.2 Composição centesimal e fibra alimentar

Os valores de proteína, lipídio, carboidrato, cinzas, fibra alimentar total, solúvel e insolúvel das farinhas do bagaço de azeitonas obtido da extração do

azeite de oliva bruto e em diferentes tratamentos podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 Composição centesimal, fibra alimentar total (FAT), solúvel (FS) e insolúvel (FI) das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva bruto e pós-tratamentos

Parâmetros	Amostras					
	HQ	Na2	ES	HF	Na1	B
Lipídios	14,01±2,41a	11,23±1,60a	11,34±0,77a	10,73±0,85a	11,37±0,49a	11,55±0,65a
Proteínas	10,25±1,44a	9,71±0,46a	9,65±1,07a	9,44±1,47a	9,03±1,29a	8,92±0,47a
Cinzas	2,36±0,06d	5,39±0,27a	3,13±0,21c	2,40±0,13d	4,11±0,25b	4,08±0,09b
FAT	61,98±0,96a	53,33±0,86b	61,56±0,53a	59,33±1,18a	54,82±2,83b	54,55±0,53b
FS	3,08±0,04a	3,31±0,39a	3,34±0,18a	2,66±0,31a	2,54±0,69a	2,86±0,40a
FI	58,91±1,00a	50,01±0,89b	58,22±0,44a	56,67±1,24a	52,28±2,67b	51,60±0,93b
ENN	11,39±4,60b	20,52±0,93a	14,31±2,57ab	18,06±3,2ab	20,66±4,54a	20,58±0,56a

Valores médios na matéria seca (%) ± desvio padrão, n=3. *ENN: extrato não nitrogenado Valores na linha com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a p > 0,05

HQ – água quente; Na2 – NaCl 2%; Es - estufa 55 graus 24h; HF – água fria; Na1 – Na Cl 1%; B – bruto. Teor de umidade: resíduos tratados em solução aquosa, média de 75%, resíduo bruto e tratado em estufa, média de 60%

Pelos dados obtidos (Tabela 1) constata-se baixo teor de proteínas, não diferindo entre os tratamentos e também de carboidratos, o que é esperado pela própria constituição das azeitonas, sobretudo as mais maduras, utilizadas para o processo de extração do azeite. Por outro lado, verifica-se um considerável teor de lipídeo na farinha do resíduo bruto (12%), não diferindo estatisticamente entre os tratamentos aplicados. O fruto da oliveira apresenta, em média, 22% de óleo (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005), que pode ser concentrado tanto na polpa quanto na semente (ALBURQUEQUE et al., 2004), sendo nesta 22%-27% do seu peso (RODRÍGUEZ et al., 2008). O fato de o bagaço de azeitonas pesquisado conter sementes trituradas contribuiu no teor final de lipídio. A quantidade de lipídio retida no bagaço pode ser muito variável, principalmente conforme a variedade da azeitona, o grau de maturação (MENZ; VRIESEKOOOP, 2010) e a tecnologia empregada na extração. Por isso, alguns estudos, como o de Vera et al. (2009), registram valores superiores ao encontrado no resíduo pesquisado, 16,5% e outros, como o de Albuquerque et al. (2004), inferiores, 11,1%.

Evidencia-se, no bagaço de azeitonas, uma quantidade apreciável de fibra alimentar com destaque para a fibra insolúvel, que difere entre os tratamentos aplicados, ao contrário do observado em relação à fibra solúvel. O maior teor obtido para fibra insolúvel foi para o resíduo tratado com água quente, mas não diferindo dos tratamentos em estufa e com água fria. Posteriormente, encontrou-se o conteúdo do resíduo tratado com NaCl 1%, que não diferiu do resíduo com NaCl 2% e do puro. As fibras alimentares apresentam componentes com variável solubilidade em água e diferentes compostos associados, como proteínas e cinzas, que interferem no teor de fibras totais. O uso da água, sem a presença de solutos, pode ter aumentado a solubilização de certos componentes no meio e esses terem sido eliminados com o descarte da água, concentrando as fibras mais insolúveis. Já o tratamento

térmico tende a solubilizar as fibras insolúveis, mas, por outro lado, pode favorecer a formação de certos compostos insolúveis com características de fibras.

A azeitona apresenta, em média, 10% a 20% de fibra alimentar total na matéria fresca (JIMÉNEZ et al., 2000), podendo variar o conteúdo e a composição, conforme a cultivar (GALANAKIS, 2011). A presença de sementes trituradas no bagaço eleva e muito o conteúdo de fibra insolúvel, uma vez que elas são constituídas, principalmente, de hemicelulose, celulose e lignina (RODRÍGUEZ et al., 2008).

O alto teor de fibra alimentar pode agregar valor ao resíduo, já que apresenta características físico-químicas que conferem propriedades funcionais, sendo a mais recentemente discutida a capacidade antioxidante. Isso ocorre pela capacidade de quelação das fibras a certos compostos fenólicos, designando-as como fibras dietéticas antioxidantes, que são definidas como um produto natural que combina os efeitos da fibra com antioxidante natural (SAURA-CALIXTO, 2011). Portanto, no caso do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva, o alto teor de fibra alimentar pode conduzir a efeitos desejáveis quanto à biodisponibilidade de seus próprios compostos fenólicos. Esse fato foi notado por Rufino et al. (2011), que encontraram, nas frações solúveis (2% da matéria seca) e insolúveis (69%) do fruto açai, excelente capacidade antioxidante, pela presença de compostos fenólicos associados. Por outro lado, essa capacidade de quelação pode ser indesejável, quando se refere a íons como cálcio e ferro (JIMÉNEZ et al., 2000).

Em relação às cinzas, evidencia-se o maior valor quando o resíduo foi tratado com solução de cloreto de sódio (NaCl 2%), seguido do resíduo bruto, que não diferiu do resíduo tratado com NaCl 1%. Em seguida, o resíduo seco em estufa e os menores valores para o resíduo tratado com água fria e quente. O acréscimo do sal insere na amostra os minerais sódio e cloretos, o que eleva o

teor final de cinzas. O uso da água faz com que ocorra uma redução de certos minerais nas amostras, por meio da lixiviação.

3.3 Perfil de ácidos graxos

Na Tabela 2 verifica-se o perfil de ácidos graxos da fração lipídica das farinhas obtidas do bagaço de azeitonas obtido da extração do azeite de oliva bruto e os submetidos a diferentes tratamentos.

Tabela 2 Perfil dos ácidos graxos, em porcentagem relativa, da fração lipídica das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva bruto e tratado

Ácidos graxos	% de ácidos graxos*					
	HQ	Na2	Es	HF	Na1	B
Palmítico (C16:0)	11,71	14,13	13,80	13,26	12,63	11,23
Estearico (C18:0)	2,78	3,82	3,58	2,70	3,19	2,03
Heptadecanoico (C17:0)	0,91	NI	NI	3,16	0,07	NI
Araquídico (C20:0)	0,47	NI	0,23	NI	0,41	0,76
Beênico (C22:0)	0,18	NI	NI	NI	0,25	0,32
Lignocérico (24:0)	NI	NI	NI	NI	NI	0,27
TOTAL SATURADOS	16,05 (2,25)	17,95 (2,02)	17,61 (2,00)	19,12 (2,05)	16,55 (1,88)	14,61 (1,69)
Oleico (C18:1c)	59,24	68,13	60,30	58,09	66,00	63,92
Oleico (C18:1t)	NI	NI	NI	NI	0,05	NI
Palmitoleico (C16:1)	1,08	1,39	1,32	NI	1,18	1,03
Cis-10-heptadecenoico (C17:1)	NI	0,21	NI	NI	0,24	0,11
Cis-11-eicosenoico (C20:1)	0,35	NI	0,43	NI	0,50	0,60
TOTAL MONOINSATURADOS	60,67 (8,50)	69,73 (7,83)	62,05 (7,04)	58,09 (6,23)	67,97 (7,73)	65,67 (7,58)
Linoleico (C18:2c)	10,53	11,08	15,21	19,37	10,49	11,47
Linoleico (C18:2t)	0,72	NI	NI	NI	NI	NI
Linolênico (C18:3)	2,49	NI	0,98	1,61	1,07	1,16
Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5)	NI	NI	NI	NI	NI	0,14
Cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	NI	NI	NI	NI	0,19	NI
TOTAL POLINSATURADOS	13,75 (1,95)	11,08 (1,24)	16,19 (1,84)	20,98 (2,25)	11,75 (1,36)	12,77 (1,47)
AGM/AGS	3,78	3,88	3,52	3,04	4,12	4,49

NI – não identificado. * valor entre parênteses corresponde a g/100 g de amostra seca

HQ – água quente; Na2 – NaCl 2%; Es - Estufa 55 graus 24h; HF – água fria; Na1 – Na Cl 1%; B – bruto. AGM – ácidos graxos monoinsaturados, AGS- ácidos graxos saturados

Nota-se que, em todas as amostras, os principais ácidos graxos detectados foram o palmítico, o oleico e o linoleico e que todas constituem uma boa fonte do ácido graxo monoinsaturado, oleico, sendo o de maior concentração detectado. Em geral, esse resultado é o que se evidencia também no azeite de oliva (ARSLAN, 2012). Assim, independente do tratamento aplicado, as farinhas obtidas contêm teores de médio (55-65%) a elevado de ácido oleico (>65%) (RONDANINI et al., 2011), sendo superior ao encontrado em óleos como de soja, milho, girassol e linhaça. O teor obtido para o ácido palmítico nas farinhas equivale ao encontrado nos óleos de soja e milho, porém, é superior aos óleos de canola, girassol e linhaça. Quanto aos ácidos graxos essenciais, linoleico e alfa-linolênico, como é esperado, o conteúdo obtido em todas as farinhas é inferior ao encontrado nos óleos de canola, girassol e linhaça.

De maneira geral, as concentrações desses três ácidos graxos na oliva são apresentadas na seguinte ordem: oleico, linoleico e palmítico. Isso se deve ao grau de maturação da oliva, que faz com que o conteúdo de ácido oleico e linoleico se eleve, estabilize, e os saturados reduzam significativamente no estágio final da maturação, conforme mencionado por Menz e Vriesekoop (2010). Isso foi evidenciado nas farinhas obtidas do resíduo bruto e as tratadas com água fria e em estufa; nas demais amostras (Na1, Na2 e água quente), o ácido palmítico foi maior que o ácido linoleico.

A relação entre monoinsaturados e saturados é elevada em todas as amostras, o que é interessante do ponto de vista nutricional, já que o consumo de ácido oleico tem sido relacionado a benefícios à saúde humana. A dieta do Mediterrâneo, na qual o azeite de oliva é a fonte primária de gordura, é associada à baixa mortalidade por doenças cardiovasculares e parte dessa funcionalidade é atribuída à elevada correlação entre monoinsaturados e os saturados. O consumo de poli-insaturados (PUFA) e monoinsaturados (MUFA) conduz a alterações nas lipoproteínas plasmáticas, como a baixa suscetibilidade

à oxidação da LDL-c. Além disso, registra-se que os ácidos graxos monoinsaturados estimulam a transcrição de RNAm para o receptor de LDL-c (SAKOUHI et al., 2008) e que a sensibilidade pós-prandial à insulina é progressivamente melhorada, com o aumento na proporção de MUFA em relação aos saturados na gordura dietética (COVAS; KONSTANTINIDOU; FITÓ, 2009).

3.4 Composição de minerais

Na Tabela 3 observam-se os valores médios de minerais das farinhas obtidas do resíduo da extração do azeite de oliva bruto e do submetido a diferentes tratamentos.

Tabela 3 Composição de minerais das farinhas do resíduo da extração do azeite de oliva bruto e tratado (mg/100 g)

Minerais	Amostras					
	HQ	Na2	Es	HF	Na1	B
K	795±7,07c	1035±21,21b	1365±21,21a	1455±35,35a	1115±21,21b	1125±35,35b
S	120b	120b	120b	120b	120b	130a
P	80±0,01b	65±7,07b	110±0,01a	70±14,14b	70±0,01b	115±7,07a
Mg	58,5±2,12bc	52,54±0,94c	73±1,41ab	62±1,41abc	58,5±7,77bc	76±2,82a
Na	35,59±0,01a	30,49±0,01e	32,71±0,01c	29,34±0,01f	33,63±0,01b	31,54±0,01d
Fe	6,43±0,96a	4,98±0,41a	5,95±0,05a	8,15±2,05a	5,40±0,22a	6,13±0,07a
B	5,57±0,02c	3,0±0,12b	2,55±0,05c	2,58±0,07c	3,59±0,03a	3,45±0,04a
Cu	1,90±0,02b	1,53±0,27bc	1,40±0,05bc	1,30±0,11bc	1,05±0,08c	3,10±0,02a
Zn	1,48±0,01b	1,48±0,28b	1,44±0,02b	1,19±0,14b	1,31±0,30b	2,31±0,16a
Mn	0,82±0,01b	0,67±0,02d	1,09±0,01a	0,87±0,02b	0,74±0,01c	1,09±0,02a
Cr	0,11±0,01cd	0,12±0,01c	0,13±0,02c	0,22±0,03b	0,04±0,01d	0,87±0,01a
Pb	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,02±0,11b	0,08±0,01a
Ca	NI	NI	NI	NI	NI	NI

*valor médio de n=2. Valores na linha com a mesma letra não diferem, a p>0,05

HQ – água quente; Na2 – NaCl 2%; Es - Estufa 55 graus 24h; HF – água fria; Na1 – Na Cl 1%; B – bruto

Verifica-se que todas as farinhas apresentam teores elevados, acima de 100 mg/100 g de amostra, para os minerais K, S, sendo que para a farinha do bagaço de azeitonas bruto também se encontra o P. Os elementos Mg e Na encontram-se entre 29 e 80 mg/100 g, entre 1 e 10 mg/100 g estão os minerais B, Cu, Mn, Zn e Fe e abaixo de 1 mg/100 g, Pb e Cr.

Para os minerais S e Fe não houve diferença significativa entre as amostras. A maioria dos minerais (P, Mg, S, Cu, Mn, Zn, Pb e Cr) apresentou teor mais elevado nas farinhas obtidas do bagaço de azeitonas bruto, indicando que o uso da água promove a remoção de certos minerais da amostra. No caso do K, evidencia-se menor concentração com o uso de água quente, o que pode ser justificado, já que o calor promove trocas químicas, físico-químicas e estruturais dos componentes dos alimentos para a água que, sendo descartada, será responsável pela grande perda desse mineral que poderá chegar a até 60% (COPETTI; OLIVEIRA; KIRINUS, 2010).

Níveis traços de metais, como Fe, Cu, Ca, Mg, Co, Ni, e Mn, são conhecidos por aumentar a taxa de oxidação em óleos, principalmente Fe e Cu, enquanto Cr, Cd e Pb são importantes devido à toxicidade. Em média, a concentração de Fe no azeite de oliva virgem varia de 0,5 a 3 mg/g e, para o Cu, valores entre 0,001 e 0,2 mg/g (ZEINER; CINDRIC; SKEVIN, 2010). Nas farinhas constatam-se valores de Fe e Cu favoráveis à oxidação lipídica.

Quanto aos níveis do metal tóxico Pb, evidenciam-se, nas farinhas, valores menores que 1 mg/kg de farinha. O Codex Alimentarius especifica, para o chumbo, um limite superior para azeitonas de mesa de, no máximo, 1 mg/kg de azeitonas e, para o azeite de oliva, de 0,10 mg/L de azeite. A ingestão diária estabelecida pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM) é de 0,21 mg para o elemento (ANGIONI et al., 2006).

O teor de minerais no resíduo pode ter influência de vários fatores, como solo, água, ar, variedade da oliva, uso de fertilizantes ou contaminação, durante processamento e o armazenamento (ZEINER; CINDRIC; SKEVIN, 2010).

3.5 Ácidos orgânicos

O perfil e a concentração dos ácidos orgânicos foram avaliados nas farinhas obtidas do bagaço de azeitonas bruto e submetido a diferentes tratamentos, e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos, por HPLC, nos extratos aquosos das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva na forma bruta e tratada

Amostras **	Ácidos orgânicos das farinhas do resíduo da extração do azeite de oliva (mg.100 ⁻¹)				
	Oxálico	Tartárico	Cítrico	Málico	Total
HQ	110,95±0,04 (95,66)c	5,03±0,19 (4,34)d	NI*	NI	115,98±0,19e
Na2	227,08±0,45 (62,53)a	12,04±0,14 (3,31)c	9,54±0,04 (2,63)b	114,50±0,17 (31,53)b	363,16±0,39a
Es	205,76±6,68 (100)b	NI	NI	NI	205,76±6,68c
HF	80,49±0,05 (57,37)d	30,38±0,05 (21,66)b	NI	29,42±0,06 (20,97)d	140,29±0,11d
Na1	61,94±0,39 (43,86)e	5,31±0,02 (3,76)d	6,25±0,04 (4,43)c	67,72± 0,14 (47,95)c	141,22±0,58d
B	33,64±0,19 (15,45)f	52,39±0,22 (24,06)a	14,08±0,05 (6,47)a	117,59±0,20 (54,02)a	217,61±0,27b

Valores expressos como média de n=3. Entre parênteses está a porcentagem relativa ao conteúdo total de ácidos orgânicos. Os valores com a mesma letra na coluna não diferem significativamente, a p>0,05, pelo teste Tukey

*NI: Não identificado. ** tipo de tratamento do resíduo. HQ - água quente; Na2 - NaCl 2%; Es - Estufa 55 graus 24h; HF - água fria; Na1- NaCl 1%; B - bruto (não tratado)

Nas amostras Na2, Na1 e B foram identificados quatro ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, cítrico e málico); na amostra HF, três ácidos orgânicos (oxálico, tartárico e málico); na HQ, dois ácidos orgânicos (oxálico e tartárico) e apenas um identificado na amostra Es, o oxálico. Isso demonstra que os tratamentos interferiram na extração desses compostos. O emprego da água contribuiu para eliminar alguns ácidos orgânicos, demonstrando a solubilidade de alguns desses compostos no meio. O uso do sal propiciou maior retenção dos ácidos na amostra, o que pode ser devido a interações com tais compostos, impedindo a eliminação na água de descarte. Já em relação ao tratamento térmico, constatou-se perda da maioria dos ácidos orgânicos.

O ácido oxálico foi o único encontrado em todas as amostras, diferindo significativamente na concentração, sendo a maior para a amostra em que se utilizou o NaCl 2% e a menor para o bagaço de azeitonas bruto. Assim, na maioria das farinhas, observa-se que o ácido oxálico foi o que teve a maior porcentagem relativa em relação ao total dos ácidos orgânicos. Na farinha obtida com o bagaço de azeitonas bruto houve maior teor para os ácidos tartárico, cítrico e málico, diferindo dos demais tratamentos.

Com esses dados evidencia-se que os tratamentos aplicados no bagaço de azeitonas alteraram tanto o perfil quanto a concentração desses ácidos nas farinhas.

A presença desses ácidos orgânicos pode ser responsável por características como proteção, estabilidade, qualidade e aroma (ERGÖNÜLL; NERGIZ, 2010). Como no caso dos ácidos málico e cítrico, descritos como responsáveis por influenciar a cor da azeitona e que, juntamente com os ácidos oxálico, tartárico, succínico e hidroxiglutarico, comportam-se como antioxidantes, por quelarem metais, inibindo a peroxidação lipídica. Fator relevante, devido à alta concentração de minerais no bagaço de azeitonas.

Por conseguinte, considera-se o ácido oxálico um composto antinutricional, por formar sais insolúveis com o cálcio e outros cátions divalentes, diminuindo sua biodisponibilidade (ARSLAN; OZCAN, 2011). Além disso, a alta ingestão do ácido oxálico pode resultar em distúrbios gastrointestinais e danos renais (VINHOLES et al., 2011). Porém, o teor do ácido oxálico no bagaço de azeitonas é cerca de sete vezes inferior ao encontrado em espinafre (REDDY; MALEWAR, 1992) e aproximadamente 4 vezes inferior ao encontrado em carambola (WILSON; SHAW; KNIGHT, 1982).

O teor e o tipo de ácidos orgânicos no bagaço de azeitonas também podem sofrer interferência de fatores, como região geográfica, estágio de maturação da azeitona, cultivar e processamentos, entre outros.

3.6 Fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*

Na Tabela 5, constata-se o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante total (AAT) *in vitro* nas farinhas do bagaço de azeitonas bruto e tratado.

Tabela 5 Fenólicos totais e atividade antioxidante total (AAT) *in vitro* pelos métodos β -caroteno, DPPH e ABTS, nas farinhas do bagaço de azeitonas bruto e tratado

Amostras	Fenólicos totais (mgGAE.100 g ⁻¹)	Atividade antioxidante				ABTS (μ m de trolox/g de amostra)
		β -caroteno (% de inibição)*	DPPH			
			(EC50) mg/L	g de amostra/g de DPPH	% de inibição**	
HQ	691,18b	55,82b	394,90b	33,73b	32,56c	1003,57b
Na2	568,51b	57,52b	382,67b	32,68b	30,11c	1001,91b
Es	645,70b	59,79b	547,14a	46,73a	23,61d	660,10c
HF	736,96b	60,26ab	287,51c	24,56c	42,67b	1107,03b
Na1	710,00b	57,83b	356,70bc	30,47bc	34,98c	1009,79b
B	1680,44a	64,91a	159,85d	13,65d	75,13a	2429,71a

Valor médio na matéria seca, n=3

*Valor na concentração (1:1) de 740,74mg/L

**Valor na concentração (1:1) de 250mg/L

HQ – água quente; Na2 – NaCl 2%; Es - estufa 55 graus 24h; HF – água fria; Na1 – Na Cl 1%; B – bruto

Analisando o teor de fenólicos totais verifica-se que todas as farinhas têm concentração elevada de fenólicos, se comparada com os teores obtidos em certas frutas, como a manga, cujo conteúdo varia de 8,71 a 193,36 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE).100 g⁻¹ da matéria fresca (MA et al., 2011) e a goiaba vermelha, teores de 170,0 a 300,8 mgGAE.100 g⁻¹ de massa fresca. No entanto, o maior conteúdo obtido foi com o uso do bagaço de azeitonas bruto, aproximadamente 1.680 mgGAE.100g⁻¹ da matéria seca, superior ao encontrado no açai, considerado boa fonte desses compostos, com teor aproximado de 1.500 mgGAE.100 g⁻¹ na matéria seca (RUFINO et al., 2011). A presença de sementes trituradas no bagaço bruto e no tratado também contribui para essa concentração, por elas apresentarem quantidades significativas desses compostos (RODRÍGUEZ et al., 2008).

Constata-se, ainda, que, nas farinhas obtidas com o bagaço de azeitonas submetido a diferentes tratamentos, o teor de fenólicos totais reduziu significativamente, em relação à farinha obtida com o bagaço bruto, com perdas variando de 56% (para a amostra tratada com água fria) a 66% (para a amostra tratada com solução salina a 2%). No entanto, entre os tratamentos empregados, não houve diferença significativa. Essa perda demonstra a natureza hidrofílica dos compostos fenólicos presentes no bagaço, sendo eliminados em soluções aquosas com redução, pelo menos em parte, do amargor característico das azeitonas. Isso é evidenciado no processamento de azeitonas de mesas, em que os compostos fenólicos são parcialmente removidos por hidrólise e por difusão e diluição em salmoura. E, com a renovação da salmoura, ocorrem a eliminação e a diluição desses compostos, acelerando, assim, o processo de diminuição do amargor típico das azeitonas verdes (NYCHAS et al., 2002; PANAGOU et al., 2008).

Os azeites de oliva apresentam concentração muito menor de compostos fenólicos que o bagaço de azeitonas, mesmo considerando o uso dos tratamentos

aplicados. Em relação ao bagaço bruto, essa concentração pode ser cerca de 100 vezes menor, como se verifica no estudo de Longobardi et al. (2012) que obtiveram conteúdo de fenólicos totais variando de 109,94 a 212,59 mgGAE.kg⁻¹. Contudo, a quantidade e o tipo de fenólicos nas azeitonas são influenciados por vários fatores, como a maturidade, a cultivar e o clima (MENZ; VRIESEKOOOP, 2010) e ainda no azeite, pelas condições de processamento, o que irá gerar bagaços com conteúdos variados.

Os compostos fenólicos nos azeites influenciam as propriedades sensoriais, como cor, aroma e amargor, e, por possuírem propriedade antioxidante, evitam o ranço oxidativo, comum em produtos ricos em ácidos graxos mono e polinsaturados, como é o caso também dos bagaços de azeitonas da extração dos azeites e, além disso, pela propriedade anti-radicaís livres, muitos estudos relacionam esses compostos ao efeito protetor à saúde humana (VINHOLES et al., 2011).

Portanto, ao se avaliar a atividade antioxidante nas farinhas, nos três ensaios *in vitro*, como descrito na Tabela 5, constata-se que a farinha obtida com o bagaço de azeitonas bruto apresenta boa atividade antioxidante, aproximadamente 65%, no controle do dano oxidativo causado pelo radical peroxil obtido pelo teste de β -caroteno-ácido linoleico. Contudo, não diferiu estatisticamente da farinha obtida com o tratamento do bagaço em água fria, apesar de se verificar uma redução dos fenólicos totais de 56,14% com esse tratamento, o que pode indicar que outros fatores estejam contribuindo para essa atividade. Mas, a farinha com o bagaço de azeitonas bruto teve uma atividade antioxidante superior à das demais farinhas tratadas. Nessas, os tratamentos propiciaram queda da atividade antioxidante variando de aproximadamente 8% (para a amostra tratada em estufa) a 14% (para a amostra tratada em solução salina). Assim, evidencia-se que uma redução dos compostos fenólicos configura uma queda na atividade antioxidante, mas não em uma relação 1:1,

indicando que outros fatores, presentes no meio e não extraídos pelos tratamentos, podem estar envolvidos com essa atividade no teste aplicado e/ou que existem diferenças na capacidade antioxidante entre os compostos fenólicos presentes no meio. Diferentes estudos têm demonstrado que a atividade antioxidante de alguns desses compostos diferem de forma individual ou combinados. A mais alta atividade foi encontrada com compostos fenólicos que têm 3,4-di-hydroxyl e 3,4,5-tri-hydroxy ligados a um anel aromático (oleuropeína e alguns de seus derivados, tal como 3,4-DHPEA-EDA) e algumas flavonas, como luteolina e apigenina (HAMDENA et al., 2009). Assim, dependendo da concentração e do perfil fenólico no bagaço de azeitonas, têm-se alterações na capacidade antioxidante, se a maior parte dos fenólicos é de ligstrosídeo agliconas e tirosol, os quais são monofenóis que tendem a apresentar pouca ou nenhuma atividade antioxidante. Se forem os difenóis, como o hidroxitirosol, verifica-se uma atividade antioxidante mais elevada (SAURACALIXTO; GONI, 2006).

Considerando o modelo de captura do radical DPPH, a farinha com o bagaço de azeitonas bruto demonstra uma considerada porcentagem de inibição (75%), sendo superior ao primeiro método, sistema β -caroteno, porém, igualmente elevada em relação às demais farinhas. No entanto, nestas constata-se que os tratamentos aplicados propiciaram quedas maiores na atividade antioxidante, de 43% (para a amostra com o bagaço de azeitonas tratado com água fria) a 69% (para o bagaço de azeitonas tratado em estufa). Verifica-se que, além da água, o processo de secagem, no caso do uso de temperaturas, também pode contribuir para a redução de compostos antioxidantes, entre eles os fenólicos.

Com esse método pode-se evidenciar maior relação entre a queda dos fenólicos totais, nos tratamentos aplicados (56% a 66%), com a queda na

atividade antioxidante (43% a 69%), sugerindo uma melhor correlação entre esses dois fatores.

Entre as farinhas tratadas, a obtida do bagaço de azeitonas tratado com água fria foi a com maior porcentagem de inibição (43%), seguida das farinhas em que o bagaço foi tratado com solução salina a 1%, com água quente e com solução salina a 2%, que não diferiram entre si. O menor valor foi para a farinha em que se utilizou o bagaço de azeitonas bruto, porém, com o emprego do tratamento térmico em estufa para o processo de secagem e obtenção da farinha.

Quanto ao EC (50) obtido para o DPPH, notam-se valores elevados, se comparados aos dos estudos de Obied et al. (2007) e Obied, Prenzler e Robards (2008), que obtiveram valores menores que 50 ppm, o que indica baixa atividade antioxidante nas farinhas dos bagaços de azeitonas pesquisados. Porém, se comparada à atividade de frutas e vegetais, considera-se elevada. No entanto, verifica-se que a farinha do bagaço bruto obteve o menor valor para o EC (50), indicando maior atividade antioxidante em relação às farinhas tratadas, as quais seguem a ordem crescente de EC (50) de HF, Na1, Na2, HQ e Es. Sendo assim, esta última apresentou a menor atividade antioxidante. Verifica-se, ainda, que uma menor relação entre g de amostra/g de DPPH foi obtida na farinha do bagaço de azeitonas bruto, diferindo significativamente das demais amostras, o que indica melhor poder antioxidante.

Uma boa atividade antioxidante também foi encontrada em todas as farinhas usando o método do radical ABTS. Contudo, a maior atividade foi observada na farinha obtida com o uso do bagaço bruto, diferindo estatisticamente das demais. Os tratamentos conduziram a uma queda da atividade antioxidante também alta, de 54% a 73%, demonstrando boa relação com conteúdo de fenólicos totais, já que estes também tiveram uma queda significativa com os tratamentos aplicados. Entre as farinhas tratadas evidencia-se que a com maior atividade antioxidante foi a amostra em que o bagaço de

azeitonas foi tratado com água fria, não diferindo das amostras em que o bagaço foi tratado com água quente, solução salina 2% e solução salina 1%. A menor atividade foi obtida para a amostra em que o bagaço, apesar de bruto, foi submetido ao tratamento térmico em estufa. A atividade antioxidante encontrada nas farinhas supera em, aproximadamente, 60 vezes a obtida em azeite de oliva, conforme o estudo de Calixto e Goñi (2006) e também a encontrada em frutas, como verificado em polpas de goiabas, 18,03 a 32,25 μM trolox/g da matéria fresca (THAIPONG et al., 2006) e na polpa de acaí, 55,79 μmol de trolox/g da matéria seca.

A presença de substâncias antioxidantes em alimentos contribui para a manutenção de suas características sensoriais, por impedir a hidrólise oxidativa de alguns constituintes e a preservação do crescimento de certos microorganismos. Por isso, o uso de certas substâncias antioxidantes sintéticas, porém, sua ingestão não tem sido benéfica à saúde humana (GHISALBERTI, 1998 citado por LAFKA et al., 2011). Portanto, a substituição desses constituintes se faz necessária e a alternativa seriam as fontes naturais de antioxidantes, como é o caso evidenciado do resíduo da extração do azeite de oliva.

Além disso, sabe-se bem que uma série de doenças humanas, como câncer, aterosclerose, problemas cardio e cerebrovasculares, diabetes, disfunção do sistema imunológico e doenças neurodegenerativas, está relacionada à ação deletéria dos radicais livres e, portanto, na dieta, faz-se necessária a presença de alimentos fontes de antioxidantes, como pode ser constatado no resíduo da extração do azeite de oliva pesquisado.

4 CONCLUSÕES

Todos os cinco tratamentos aplicados ao resíduo conservam os compostos químicos (proteínas, lipídeos e fibras solúveis). Apesar de terem sido encontradas diferenças significativas no conteúdo de fibra insolúvel entre os tratamentos, todas as farinhas apresentaram valor considerável desse polissacarídeo.

Em se tratando da composição de minerais, a maior parte deles foi encontrada em teor elevado na farinha obtida do resíduo bruto, destacando-se o alto teor de potássio, sobretudo na farinha tratada com água à temperatura ambiente e a baixa toxicidade em todas as farinhas, no que se refere à concentração do metal Pb.

Em todas as farinhas constatou-se a presença dos ácidos graxos palmítico, oleico e linoleico, com menor valor desse último, sendo os teores de ácido oleico de médio (55-65%) a elevado (>65%).

As farinhas avaliadas diferiram quanto ao perfil e à concentração de ácidos orgânicos, tendo o ácido oxálico sido o único encontrado em todas as amostras, mas em maior concentração na farinha em que se utilizou o NaCl 2% e a menor para o resíduo bruto. O emprego do tratamento térmico conduziu a uma perda dos ácidos orgânicos, tartárico cítrico e málico.

Todos os tratamentos propiciaram queda significativa nos teores dos compostos fenólicos totais, não existindo diferenças entre eles, o que demonstra a natureza polar desses compostos e sugere uma possível redução no amargor dessas farinhas.

A diminuição dos compostos fenólicos gerou queda na capacidade antioxidante *in vitro* das farinhas obtidas do resíduo da extração do azeite de oliva nos cinco tratamentos empregados. Apesar disso, evidenciou-se que essas

farinhas continuavam tendo propriedade antioxidante expressiva, se comparadas a algumas frutas.

Dentre os testes utilizados, o emprego da água fria constitui boa opção para o tratamento do resíduo da extração do azeite de oliva.

REFERÊNCIAS

ALBURQUERQUE, J. A. et al. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, n. 2, p. 195-200, Jan. 2004.

ANGIONI, A. et al. Influence of olive cultivars and period of harvest on the contents of Cu, Cd, Pb, and Zn in virgin olive oils. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 3, p. 525-529, Jan. 2006.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 4, 544 p.

ARSLAN, D. Physico-chemical characteristics of olive fruits of Turkish varieties from the province of Hatay. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 63, n. 2, p. 158-166, abr./jun. 2012.

ARSLAN, D.; OZCAN, M. M. Influence of growing area and harvest date on the organic acid composition of olive fruits from Gemlik variety. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 633-641, Sept. 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. Washington, 1990. 1094 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. Washington, 2000. 1094 p.

CABRERA, A. et al. Estudio del efecto de la adición de alperujo sobre la persistencia de diuron en el cultivo del olivar. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 33, n. 1, p. 209-216, 2010.

CALIXTO, F.; GOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 3, p. 442-447, Feb. 2006.

COPETTI, C.; OLIVEIRA, V. R. de; KIRINUS, P. Avaliação da redução de potássio em hortaliças submetidas a diferentes métodos de cocção para possível utilização na dietoterapia renal. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 5, p. 831-838, set./out. 2010.

COVAS, M. I.; KONSTANTINIDOU, V.; FITÓ, M. Olive oil and cardiovascular health. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Hagerstown, v. 54, n. 6, p. 477-482, Dec. 2009.

ERGÖNÜLL, P. G.; NERGIZ, C. Determination of organic acids in olive fruit by HPLC. **Czech Journal Food Science**, Praha, v. 28, n. 3, p. 202-220, 2010.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FICK, S.; GREEN, R. Specializes instrumentation and procedures for improved acoust-emission and ultrasonic-attenuation monitoring of fatigue damage. **Materials Evaluation**, Evanston, v. 38, n. 2, p. S10-S11, 1980.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, p. 498-509, 1957.

GALANAKIS, C. M. Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications: review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 175-184, Apr. 2011.

GÓMEZ-GONZÁLEZ, S.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; CASTRO, M. D. L. de. Fatty acid profiling of the main tissues of spanish olive fruit: effect of the oil extraction method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 87, n. 12, p. 1413-1423, Dec. 2010.

HAMDENA, K. et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 180, n. 3, p. 421-432, Aug. 2009.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. A. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, p. 475-477, 1973.

JIMÉNEZ, A. et al. Dietary fibre content of table olives processed under different European styles: study of physico-chemical characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 13, p. 1903-1908, Oct. 2000.

LAFKA, T. I. et al. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. **Food Chemistry**, London, v. 12, n. 1, p. 92-98, Mar. 2011.

LONGOBARDI, F. et al. Characterisation of the geographical origin of Western Greek virgin olive oils based on instrumental and multivariate statistical analysis. **Food Chemistry**, London, v. 133, n. 1, p. 169-175, July 2012.

MA, X. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 102-107, May 2011.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C.; BENASSI, V. de T. **Óleos: alimentos funcionais**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 91 p.

MARKET of olive residues for energy. Disponível em:
<http://www.moreintelligentenergy.eu/public/file/download/D4_2%20ES.pdf>.
Acesso em: 25 jul. 2012.

MENZ, G.; VRIESEKOOOP, F. Physical and chemical changes during the maturation of gordal sevilla olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 8, p. 4934-4938, Mar. 2010.

NYCHAS, G. J. E. et al. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 173-177, Mar. 2002.

OBIED, H. K. et al. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 1238-1248, Nov. 2007.

OBIED, H. K.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 1, p. 171-178, Nov. 2008.

PANAGOUE, E. Z. et al. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 2, p. 348-358, Feb. 2008.

PASQUALONE, A. et al. Characterization of virgin olive oil from Leucocarpa cultivar by chemical and DNA analysis. **Food Research International**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 188-193, July 2012.

REDDY, N. S.; MALEWAR, V. G. Bio-availability of iron from spinach (*Spinacia oleracea*) cultivated in soil fortified with graded levels of iron. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 42, n. 4, p. 313-318, 1992.

RODRIGUES, C. I. et al. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 5, p. 440-448, Aug. 2007.

RODRÍGUEZ, G. et al. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 13, p. 5261-5269, Sept. 2008.

RONDANINI, D. P. et al. Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of Northwestern Argentina (La Rioja). **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 62, n. 4, p. 399-409, 2011.

RUFINO, M. do S. M. et al. Açai (Euterpe oleraceae) 'BRS Pará': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2100-2106, Aug. 2011.

RUFINO, M. do S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/Ácido Linoleico. Brasília: EMBRAPA, 2006. 16 p. (Comunicado Técnico, 126).

RUFINO, M. do S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Brasília: EMBRAPA, 2007. 12 p. (Comunicado Técnico, 127).

SAKOUHI, F. et al. α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europaea* L.): changes in their composition during ripening and processing. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 833-839, June 2008.

SAURA-CALIXTO, F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 1, p. 43-49, Dec. 2011.

SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 6, p. 442-447, Feb. 2006.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 6/7, p. 669-675, Sept./Nov. 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test methods for evaluation solid waste physical and chemical methods: microwave assisted acid digest of sediments, sludges, soils and oils, SW 846.** Washington, 1998. 846 p.

VERA, R. et al. Feeding dry olive cake modifies subcutaneous fat composition in lambs, noting cake resistance to degradation and peroxidation. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 69, n. 4, p. 548-559, 2009.

VINHOLES, J. et al. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 2, p. 454-462, Nov. 2011.

WATERHOUSE, A. L. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: J. Wiley, 2002. p. 11-18.

WILSON, C. W.; SHAW, P. E.; KNIGHT, R. J. Analysis of oxalic acid in carambola (*Averrhoa carambola* L.) and spinach by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 30, p. 1106-1106, 1982.

ZEINER, M.; CINDRIC, I. J.; SKEVIN, D. Characterization of extra virgin olive oils derived from the Croatian cultivar Oblica. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 112, n. 11, p. 1248-1252, Nov. 2010.

CAPÍTULO 3

Efeito da farinha do resíduo da extração do azeite de oliva em dietas ricas em colesterol utilizadas por ratos Wistar

RESUMO

Objetivou-se, com este trabalho, avaliar o efeito da farinha obtida do bagaço de azeitonas oriundo da extração do azeite de oliva da cultivar Arbequina, do sul de Minas Gerais, na dieta de ratos Wistar. Foram utilizados 42 ratos machos, adultos, distribuídos em 7 grupos conforme designação: controle positivo (C+) com dieta padrão AIN – 93M durante todo o experimento; controle negativo (C-) com dieta indutora da elevação do colesterol (4% de GVH, 0,7% de colesterol e 1% de ácido cólico); FT1%, grupo com dieta indutora da elevação do colesterol mais 1% de farinha do bagaço tratado; FT5%, grupo com dieta indutora de elevação do colesterol mais 5% de farinha do bagaço tratado; FT10%, grupo com dieta indutora da elevação do colesterol mais 10% de farinha do bagaço tratado e FB1%, grupo com dieta indutora da elevação do colesterol mais 1% de farinha do bagaço bruto. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e, para as análises estatísticas, as diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas pelo teste de Tukey. Foram feitas as análises de ingestão alimentar, desenvolvimento ponderal, peso das fezes, digestibilidade fenólica e lipídica e, após o sacrifício dos animais, o sangue e o fígado foram coletados para a realização de lipidograma, análises das aminotransferases, AST e ALT, peso e histologia hepática. Os diferentes grupos não apresentaram alterações no CMD, GMD, CEA e IMC, mostrando que a introdução das farinhas não promoveu alterações no consumo alimentar e no desenvolvimento dos animais. As dietas apresentaram digestibilidade lipídica entre 94% e 98% e fenólica entre 73% e 84%. Porém, FB1% teve maior teor de lipídeo excretado, não diferindo do grupo FT10% e C-, o que sugere alguma influência do teor de fibras da farinha. O aumento do consumo de fenólicos (grupo FT10%) promoveu maior perda fecal desses compostos (44 mg), o que sugere a obtenção de fezes mais escuras. Todos os grupos submetidos às dietas indutoras da elevação do colesterol não diferiram estatisticamente quanto à glicemia caudal do controle C+. A adição das farinhas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva bruto e tratado não teve efeito positivo sobre colesterol total plasmático, LDL-c, HDL-c, mas o grupo FT1% obteve níveis de TAG e VLDL-c semelhante ao grupo Controle C+. Nível elevado de ALT, em relação ao

grupo C+, foi constatado para o grupo que recebeu a dieta indutora da elevação do colesterol com introdução de 5% da farinha do resíduo. Os demais grupos não diferiram do controle C+. As análises do peso e histologia hepática revelaram acúmulo de lipídios hepáticos, com aumento do peso do órgão, o que pode ser característica de esteatose hepática, em todos os grupos que receberam a dieta indutora da elevação do colesterol sérico, mesmo com a introdução da farinha do bagaço de azeitonas. A farinha do bagaço de azeitonas, apesar de ter apresentado alto teor fenólico, não foi eficaz na prevenção da elevação do colesterol sérico, quando introduzida em dietas com perfil lipídico favorável a esse aumento. Isso sugere que os compostos fenólicos presentes no bagaço de azeitonas, mesmo em grande concentração, não exercem efeito hipocolesterolêmico.

Palavras-chave: Resíduo do azeite de oliva. Estudo em ratos. Dieta indutora da elevação do colesterol. Lipídeos séricos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the flour effect obtained from olive pomace come from the extraction of olive oil - Arbequina cultivar - in southern Minas Gerais, in the diet of rats Wistar. Forty-two rats male, adults were used, divided into 7 groups as designated: positive control (C+) with standard diet AIN - 93M throughout the experiment; Negative Control (C-) inducing diets of increase cholesterol (4% GVH, 0.7% cholesterol and 1% cholic acid); FT% group with inducing diets of increase cholesterol plus 1% flour of treated residue; FT5%, group with inducing diets of increase cholesterol plus 5% flour of treated residue; FT10% group with inducing diets of increase cholesterol plus 10% flour of treated residue and FB 1% group with inducing diets of increase cholesterol plus 1% flour of raw residue. The design was completely randomized and the statistical analyzes the differences of $p < 0.05$ were considered significant by Tukey test. Analyses were made of food intake, weight gain, stool weight, phenolic and lipid digestibility and after killing the animal the blood and liver were collected to perform the lipid profile, aminotransferases analysis, AST and ALT, weight and liver histology. Different groups showed no changes in the CMD, GMD, CEA BMI Showing that the introduction of flour did not change in food intake and development of animals. The diets had lipid digestibility between 94 and 98% and phenolic from 73 to 84%. However, the FB1% had higher lipid content excreted did not differ from FT10% group and C- which suggesting some influence of flour fiber content. The increased consumption of phenolic, (FT10% group), promoted higher fecal loss of these compounds (44 mg), which suggests getting darker stools. All groups submitted to inducing diets of increase cholesterol did not differ statistically as to the glycemia caudal of the control C+. The flour addition of olive pomace from the raw olive oil extraction and treated had no a positive effect on plasmatic total cholesterol, LDL-c, HDL-c, but the FT1% group had levels of TAG and VLDL-c similar to Control C+ group. High ALT level, in relation to the C + group was observed for the group that received inducing diets of increase cholesterol with the introduction 5% of flour residue. The other groups did not differ from control C+. The weight analysis and liver histology revealed accumulation of hepatic lipids with increased of organ weight, which may be characteristic of hepatic steatosis in all groups that receiving the inducing diets of increase serum cholesterol, even with the introduction of olive pomace flour. The flour of olive pomace, despite having high phenolic content was not effective in preventing the increase serum cholesterol when introduced in diets with a favorable lipid profile to

this increase. This suggests that the phenolic compounds present in the olive pomace, even in high concentration, does not exert hypocholesterolemic effect.

Keywords: Olive oil residue. Study in rats. Inducing diets of increase cholesterol. Serum lipids.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da oliveira (*Olea europaea* L.) vem despontando no Brasil, objetivando, além de outros, a produção do azeite de oliva. Com isso, surge a preocupação com o descarte do bagaço de azeitonas gerado pelas indústrias. Em média, 100 kg de azeitonas produzem cerca de 20 kg de azeite, sendo gerado o bagaço, que ainda permanece com considerado teor de nutrientes e outros compostos de valor, porém, muitas vezes é descartado de forma inadequada, poluindo o meio ambiente.

O bagaço de azeitonas produzido na extração do azeite de oliva na cidade de Maria da Fé, Minas Gerais, é oriundo do sistema de duas fases de centrifugação e constitui uma massa pastosa formada por polpa, sementes e água. Assim como o azeite de oliva, esse tipo de resíduo representa uma fonte de compostos antioxidantes, sobretudo os polifenóis, além de perfil lipídico com maior relação insaturado *versus* saturados.

O azeite de oliva, em virtude desses componentes, é considerado um alimento benéfico à saúde humana por ser capaz de atuar, principalmente, como fator protetor das doenças cardiovasculares. Esse benefício é amplamente estudado e é conferido aos seus polifenóis, que representam apenas 2% do conteúdo total das olivas, sendo o restante eliminado e retido no bagaço pela grande natureza polar da maioria dos compostos.

A importância dos polifenóis é atribuída ao seu poder antioxidante que exerce papel de destaque na prevenção de várias patologias, por evitar os danos oxidativos ocasionados pelo desequilíbrio entre os radicais livres e os sistemas antioxidantes do organismo e também pela ingestão desses produtos já formados, em algumas situações em exagero, pelos processamentos empregados nos alimentos. Assim, crescem os estudos sobre esses resíduos, principalmente buscando o isolamento dessas substâncias antioxidantes (LAFKA et al., 2011;

OBIED; PRENZLER; ROBARDS, 2008; RODRIGUEZ et al., 2007). Dessa forma, é necessário ampliar os conhecimentos sobre o efeito desse resíduo no sistema biológico, quando introduzido na matriz alimentar, já que existe a busca constante por alternativas alimentares que sejam eficazes em reduzir o risco de patologias cujo fator desencadeante é o estresse oxidativo.

Baseado nessas evidências, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da farinha obtida do resíduo da extração do azeite de oliva da região sul de Minas Gerais, em sua forma bruta e tratada, na dieta de ratos Wistar, de maneira a verificar a atuação dos seus componentes, sobretudo os compostos fenólicos no controle lipidêmico desses animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

A amostra do bagaço de azeitonas foi obtida pela extração do azeite de oliva, cultivar Arbequina, em março de 2012, pelo sistema de duas fases, realizado na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) de Maria da Fé, região do sul de Minas Gerais. O bagaço foi armazenado em embalagens de polietileno e congelado, a -40 °C, para posterior utilização.

2.2 Tratamento da amostra e obtenção das farinhas

O bagaço de azeitonas foi submetido ao tratamento em água à temperatura de 25 °C sob imersão, na proporção de 1:1 p/v, por duas horas. A determinação desse tempo de permanência em solução foi estabelecida mediante a realização de pré-testes, de forma a conseguir menor perda significativa de fenólicos totais. Após a filtragem do resíduo em peneira de malha 20 (ABNT 20) com o descarte da solução aquosa, esse foi submetido ao processo de liofilização (L108, Lio top). Para a obtenção da farinha, os bagaços de azeitonas bruto e tratado liofilizados foram triturados em moinho de facas e, durante esse processo, parte das sementes foi triturada e a outra, eliminada.

2.2.1 Composição centesimal das farinhas do resíduo da extração do azeite de oliva

A composição centesimal foi realizada nas farinhas do bagaço de azeitonas bruto e tratado, conforme Association of Official Analytical Chemists

- AOAC (1990). O extrato não nitrogenado (ENN) foi obtido por diferença. Os resultados foram expressos em porcentagem. Essa análise foi realizada para a obtenção dos valores médios dos compostos de cada farinha e, assim, efetuar os ajustes necessários no padrão da AIN – 93M.

2.2.2 Ensaio *in vivo* e composição química da dieta

A pesquisa teve início mediante o parecer favorável do Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras, protocolo número 030/11, de 24 de novembro de 2011 (Anexo I)

O ensaio com os animais experimentais foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Viçosa, campus de Rio Paranaíba. Os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório Santa Cecília, na cidade de Lavras, MG e as análises da composição centesimal e de fenólicos totais, nos laboratórios do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

Para o ensaio *in vivo* foram utilizados 42 ratos (*Rattus norvegicus*), machos adultos, albinos da linhagem Wistar, adquiridos do biotério central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com peso médio de 133 g.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 22 °C, recebendo água potável e dieta, ambos *ad libitum*.

As dietas oferecidas aos animais tiveram sua composição baseada na formulação padrão recomendada pelo *American Institute of Nutrition* AIN-93M para fase de manutenção (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

O período experimental durou 84 dias e foi dividido em três fases, sendo: fase 1, adaptação; fase 2, introdução da dieta para indução do aumento do

colesterol sérico e a fase 3, introdução das farinhas obtidas do resíduo bruto e tratado.

Na fase 1, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos com sete animais, evitando-se eventuais diferenças intergrupais no peso corporal. Todos os grupos receberam a dieta padrão, AIN-93M, durante sete dias, com a finalidade de adaptação.

Na fase 2, seis grupos de animais, com exceção do grupo controle, AIN-93M, receberam a dieta padrão modificada no seu perfil lipídico, para induzir a elevação do colesterol sérico. Nos primeiros 17 dias, essa dieta foi constituída de 5% de lipídio, sendo 3% de gordura vegetal hidrogenada e 2% de óleo de soja, acrescida de 0,1% de ácido cólico e 0,7% de colesterol. Posteriormente, em virtude de uma análise do colesterol sanguíneo caudal utilizando aparelho accutrend plus, verificou-se a necessidade de elevar o teor lipídico da dieta para 6%, aumentando a quantidade de gordura vegetal hidrogenada para 4%, no intuito de propiciar maior elevação do colesterol sérico.

Na fase 3, decorridos 32 dias em uso de dieta indutora da elevação do colesterol, quatro grupos começaram a receber, acrescidas nessa dieta, quantidades estabelecidas da farinha do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva, com substituição das fontes glicídica, lipídica e proteica, da dieta padrão, conforme a caracterização química das farinhas, de forma que as dietas ficassem isoenergéticas, isoglicídicas e isoproteicas. Assim, três grupos receberam nas dietas o acréscimo de 1%, 5% e 10% da farinha do bagaço de azeitonas tratado, e um grupo recebeu o acréscimo de 1% da farinha do bagaço bruto. Tais dietas foram introduzidas para consumo por um período de 28 dias.

Portanto, no experimento, têm-se seis diferentes dietas modificadas seguindo o padrão da AIN - 93M e definidas conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Composição das seis dietas oferecidas aos animais experimentais (g/kg)

Ingredientes	Dieta	Dieta**	Dieta**	Dieta**	Dieta**	Dieta**
	(C+)	(C-)	FT1%	FT5%	FT10%	FB1%
g/kg						
Amido de milho	445,69	437,69	432,49	411,60	385,70	432,30
Amido dextrinizado	155	155	155	155	155	155
Caseína	140	140	138,90	134,80	129,60	139
Sacarose	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	60	20	18,20	10,90	17,0	18,20
G.V. H*	---	40	40	40	40	40
Celulose	50	50	48,10	40,40	30,70	48,20
Pré-mix mineral	35	35	35	35	35	35
Pré-mix vitamínico	10	10	10	10	10	10
L-cistina	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
Bitartarato de colina	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Terbutil-hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
Colesterol	---	7	7	7	7	7
Ácido cólico	---	1	1	1	1	1
Farinha do bagaço de azeitonas bruto	---	---	---	---	---	10
Farinha do bagaço de azeitonas tratado	---	---	10	50	100	---
Total (g)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

*GVH: Gordura vegetal hidrogenada

**Dieta indutora da elevação do colesterol administrada nesses grupos por 77 dias

C+ = controle positivo (Dieta AIN – 93M); C- = controle negativo (dieta indutora da elevação do colesterol); FT1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT5% = 5% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT10% = 10% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FB1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas bruto

massa corporal (IMC), sendo $IMC = \text{peso (g)} / \text{comprimento (cm)}^2$ (NOVELLI et al., 2007).

O controle do consumo de ração e o desenvolvimento ponderal permitiram os cálculos de consumo médio diário (CMD), ganho de peso médio diário (GMD) e coeficiente de eficácia alimentar (CEA), por meio da equação: $CEA = [\text{ganho de peso (g)}] / [\text{consumo alimentar (g)}]$, com a finalidade de se verificar a relação entre ganho de peso e o consumo alimentar (PELLET; YOUNG, 1980).

2.2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais nas amostras

Os compostos fenólicos foram determinados nas dietas elaboradas para o ensaio *in vivo* e nas fezes dos ratos ao final do experimento. Para tanto, realizou-se a extração dos compostos fenólicos, em que 1 g de amostra foi adicionado em 40 mL de álcool metílico 50%, homogeneizado e mantido à temperatura ambiente, protegido da luz, por 1 hora. A solução foi centrifugada a 23,713 g, por 17 minutos. O sobrenadante foi coletado e foram adicionados 40 mL de acetona 70%, sendo homogeneizado e deixado em repouso por 1 hora. Após nova centrifugação, coletou-se o sobrenadante, adicionou-se ao primeiro e completou-se o volume para 100 mL, com água destilada. O teor de fenólicos totais foi obtido pelo método de Waterhouse (2002), empregando-se o reagente Folin-Ciocalteu e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico ($\text{mgGAE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

2.2.5 Análises da digestibilidade lipídica e dos fenólicos totais

A ingestão alimentar foi utilizada para o cálculo do coeficiente da digestibilidade lipídica e digestibilidade dos fenólicos totais, que consiste na

diferença entre o que foi ingerido destes compostos e a excreção fecal, dividida pela quantidade ingerida, multiplicada por 100 (HEREDIA et al., 2007).

Durante os três últimos dias do experimento, todas as fezes produzidas pelos animais foram coletadas por grupo, armazenadas em potes plásticos com tampas e congeladas, a -15 °C. Posteriormente, foram pesadas e trituradas de maneira a obter um pó homogêneo para avaliação do teor de lipídeos, pelo método Shoxlet da AOAC (1990) e dos fenólicos totais, pelo método de Folin Cicateu (WATERHOUSE, 2002).

2.2.6 Sacrifícios dos animais e coleta de amostras

Ao término do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, pesados e analisada a glicose capilar caudal por meio do aparelho *Accutrend plus*. Posteriormente, foram anestesiados, usando o anestésico tiopental, na dosagem de 40 mg/kg de peso do animal a 2,5% (CARREGARO; CASTRO; MARTINS, 2005), e sacrificados. O anestésico foi aplicado com agulhas de tamanho 25x5 mm, na metade posterior do abdome (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005), mediante a contenção dos animais, erguendo-os pela pele do dorso na altura do pescoço.

Em seguida, efetuou-se a secção abdominal e torácica com a coleta das amostras de sangue na artéria aorta, o que promoveu a morte dos animais por parada cardíaca, devido à hipovolemia. O sangue coletado foi transferido para tubos de ensaio, sem anticoagulante e centrifugado, a 4.000 rpm, por 10 minutos. O soro obtido foi armazenado sob refrigeração (-4 °C) e utilizado na avaliação do lipidograma e das aminotransferases, AST e ALT.

Após a morte do animal, ele foi eviscerado, com a retirada do fígado para análise histológica.

As carcaças dos animais foram congeladas para posterior descarte (ALMEIDA, 2003).

2.2.7 Análise do lipidograma e das aminotransferases

Para as análises de colesterol total e triacilgliceróis, utilizou-se o método colorimétrico-enzimático trinder e, para HDL-c, o método acelerador-detergente seletivo (inibição seletiva) com kits comerciais Labtest. Para a obtenção do valor da LDL-c foi feito cálculo a partir da dosagem do colesterol total, triacilglicerol e HDL-c, segundo a equação de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972), em que $LDL\text{ colesterol mg/dL} = \text{colesterol total} - HDL\text{-c} - (\text{triglicerídeos}/5)$, e o valor da VLDL-c foi estimado a partir da dosagem de triacilgliceróis dividido por cinco. Para as aminotransferases foi utilizada a metodologia cinética-UV dos kits comerciais Labtest.

2.2.8 Análise do peso do fígado e da histologia hepática

Os fígados dos animais foram lavados com solução salina (0,9%), pesados e seccionados em locais padronizados, parte do lóbulo esquerdo e armazenados em formaldeído 10%. Posteriormente, as amostras foram novamente seccionadas, com padronização do tamanho em 2 cm e mantidas em etanol 70%, até o momento da inclusão em parafina.

Os cortes hepáticos de 4 μm , em micrótomo rotativo (Reichert-jung 2045 Multicut, Germany), foram corados por hematoxilina-eosina (H&E) e analisados sob microscopia de luz (Olympus BX 41), para uma análise qualitativa quanto à histologia desses tecidos (ALMEIDA, 2003).

2.3 Análise estatística

Efetou-se a estatística descritiva e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Para o ensaio biológico, foram utilizados seis tratamentos com sete repetições. Os dados obtidos de cada análise foram expressos como média±desvio padrão. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey, de forma a verificar diferenças significantes, a $p < 0,05$, pelo software Sisvar (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição centesimal das farinhas dos bagaços de azeitonas bruto e tratado

Os teores de lipídio, proteínas, fibra bruta, cinzas e extrato não nitrogenado das farinhas obtidas do bagaço de azeitonas, da extração do azeite de oliva, bruto e tratado, podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 Composição centesimal das farinhas obtidas do bagaço de azeitonas, da extração do azeite de oliva, bruto e tratado liofilizado e triturado

Parâmetros	Farinha do bagaço bruto	Farinha do bagaço tratado
Lipídio (%)	18,05±0,07a	18,25±0,07a
Proteína (%)	10,50±0,35a	10,33±0,25a
Fibra bruta (%)	18,00±0,57a	19,25±0,50a
Cinzas (%)	5,11±0,27a	4,53±0,12a
ENN* (%)	34,72±0,50b	38,31±0,48a
Umidade (%)	13,80±0,05a	9,34±0,04b

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Valor médio±desvio padrão, n=2

*ENN: extrato não nitrogenado

Verifica-se, pelos dados da Tabela 2, que não há diferença ($p>0,05$) entre as duas farinhas, quanto aos valores de lipídeos, proteínas, fibra bruta e cinzas, indicando que o tratamento aplicado não influenciou essa composição. Considerável teor de lipídeo pode ser evidenciado nas duas farinhas. Como mencionado por Menz e Vriesekoop (2010), a quantidade de lipídio retida no resíduo pode ser muito variável, principalmente conforme a variedade da azeitona, o grau de maturação e a tecnologia empregada na extração. Os teores de lipídios foram superiores aos de Vera et al. (2009), que registraram valores de 16,5% e os de Albuquerque et al. (2004), de 11,1%.

3.2 Consumo alimentar, ganho de peso, coeficiente de eficácia alimentar e índice de massa corporal

Na Tabela 3 são apresentados os valores médios diários obtidos do consumo das dietas, do ganho de peso, o coeficiente de eficácia alimentar e o índice de massa corporal dos ratos, durante a fase experimental.

Tabela 3 Valores médios diários de consumo das dietas (CMD), ganho de peso médio diário (GMD), coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e índice de massa corporal (IMC) dos animais, durante o experimento

Grupos	CMD(g)	GMD (g)	CEA	IMC inicial (g.cm ²)	IMC final (g.cm ²)
C+	19,06±0,84ns	3,40±0,41ns	0,18±0,01ns	0,46±0,03ns	0,84±0,08ns
C-	18,69±0,86ns	3,22±0,38ns	0,17±0,02ns	0,48±0,04ns	0,80±0,08ns
FT1%	18,90±1,01ns	3,22±0,49ns	0,17±0,02ns	0,46±0,03ns	0,79±0,08ns
FT5%	19,46±0,34ns	3,24±0,38ns	0,17±0,02ns	0,47±0,06ns	0,80±0,06ns
FT10%	19,73±0,97ns	3,18±0,56ns	0,16±0,02ns	0,46±0,03ns	0,75±0,07ns
FB1%	19,31±1,13ns	3,61±0,51ns	0,19±0,03ns	0,47±0,03ns	0,81±0,07ns

ns – não significativo, pelo teste F, na coluna

C+ = controle positivo (Dieta AIN – 93M); C- = controle negativo (dieta indutora da elevação do colesterol); FT1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT5% = 5% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT10% = 10% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FB1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas bruto

O tipo de dieta não interferiu significativamente no consumo médio diário dos ratos, demonstrando que, mesmo com a introdução das farinhas do bagaço de azeitonas, da extração do azeite de oliva, tanto o bruto quanto o tratado, o consumo não foi afetado de forma significativa. Considera-se que isso seria um ponto positivo quanto à sua reutilização como farinha e para novos estudos tecnológicos na área sensorial, já que o esperado era que o consumo alimentar fosse reduzido com a utilização da farinha, sobretudo a do bagaço bruto, por apresentar mais elevada concentração de fenólicos que, segundo Inarejos-García et al. (2010) e Lafka et al. (2011), estão vinculados ao amargor característico das azeitonas cruas. Inarejos-García et al. (2010) atribuem o *flavor* do azeite não só à concentração de fenólicos, mas também ao seu perfil, já que algumas transformações, pertinentes ao processo de extração do azeite, podem gerar novos fenólicos com características sensoriais distintas. Sugere-se que tal bagaço tenha sofrido transformações em seu perfil de fenólicos, produzindo derivados com características não amarga. Já no bagaço tratado com água é esperada, pela polaridade desses compostos, uma redução na farinha, minimizando, assim, o sabor amargo.

Considerando o GMD dos animais, o CEA e o IMC inicial e final, verifica-se que não houve diferenças significativas entre os grupos, mesmo aqueles com dietas de elevação do colesterol. Com isso, sugere-se que a introdução do bagaço de azeitona, da extração do azeite de oliva, na forma de farinha, não afetou o desenvolvimento ponderal e o IMC dos ratos, durante os 28 dias em que foi utilizada.

3.3 Digestibilidade de lipídeos e fenólicos totais

Na Tabela 4 constata-se a quantidade de lipídios e fenólicos consumidos e excretados nas fezes, além do peso das fezes excretadas nos últimos três dias de experimentação animal.

Tabela 4 Conteúdo de lipídeos e fenólicos totais consumidos nas dietas e excretados nas fezes, expressos na matéria integral, peso das fezes excretadas pelos animais durante os três últimos dias do experimento e os valores das digestibilidades lipídicas (DL) e fenólicas (DF)

Parâmetros	Grupos					
	C+	C-	FT1%	FT5%	FT10%	FB1%
Lipídios consumidos (g)	5,54±0,65a	5,88±0,40a	6,39±0,92a	6,57±0,64a	6,59±0,84a	6,70±0,87a
Lipídios excretados (g)	0,11±0,03d	0,36±0,09ab	0,23±0,04c	0,28±0,03bc	0,33±0,04ab	0,40±0,07a
	(1,98%)	(6,11%)	(3,71%)	(4,29%)	(5,08%)	(5,95%)
DL* (%)	98,00	94,00	96,00	96,00	95,00	94,00
Fenólicos totais Consumidos (mg)	24,11±2,8de	21,08±1,39e	43,64±6,30cd	139,83±13,77b	220,04±28,15a	50,13±6,53c
Fenólicos totais Excretados (mg)	5,59±1,54c	7,25±2,60c	7,96±2,95c	21,85±4,76b	44,37±12,22a	13,45±6,77bc
	(23,19%)	(34,39%)	(18,24%)	(15,63%)	(20,16%)	(26,83%)
DF** (%)	77,00	66,00	82,00	84,00	80,00	73,00
Peso das fezes (g)	5,03±0,64b	5,97±0,88b	5,28±0,86b	6,68±0,91ab	8,47±1,41a	6,88±1,89ab

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey
 C+ = controle positivo (Dieta AIN – 93M); C- = controle negativo (dieta indutora da elevação do colesterol); FT1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT5% = 5% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT10% = 10% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FB1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas bruto

* (DL) % Digestibilidade lipídica = (lipídios ingeridos – lipídios excretados) x 100 / lipídios ingeridos

** (DF) % Digestibilidade fenólica = (fenólicos ingeridos – fenólicos excretados) x 100 / fenólicos ingeridos

Verifica-se, pelos dados da Tabela 4, que todas as dietas tiveram digestibilidade lipídica elevada, entre 94% e 98%, demonstrando bom aproveitamento dos lipídeos pelos animais. Porém, diferenças significativas podem ser verificadas entre as dietas quanto ao teor de lipídeo excretado, tendo o grupo com maior perda fecal e, assim, menor digestibilidade, em relação ao controle (C+), sido o com a farinha do bagaço bruto a 1% (FB1%), não diferindo estatisticamente dos grupos, FT10% e C-. O grupo de maior aproveitamento lipídico foi o com a dieta padrão da AIN - 93M (C+).

Esses dados demonstram que a introdução da farinha do bagaço na dieta propiciou uma excreção maior dos lipídios, o que pode ser explicado pela presença, nessas farinhas, de fibras do tipo solúvel, apesar de ser em pequena quantidade, que podem atuar reduzindo a absorção lipídica por quelação com certos lipídeos e também pela retenção de sais biliares. Contudo, evidencia-se também que os animais que consumiram a dieta indutora da elevação do colesterol, isenta de farinha (C-), obtiveram uma excreção significativa dos lipídios nas fezes, em comparação ao grupo (C+). Isso sugere que a quantidade de colesterol dessas dietas, na luz intestinal, pode ter uma absorção limitada, ou seja, não sendo diretamente proporcional ao seu aumento na ingestão dietética. Esse fato pode ser devido à presença de celulose na dieta, do tipo de fibra de característica estrutural e que tem a capacidade de reter água e cátions e não compostos orgânicos, como os lipídeos e os sais biliares e que aumentam o trânsito intestinal.

Quanto aos fenólicos totais, evidencia-se maior consumo para o grupo que recebeu a dieta com adição de 10% da farinha do bagaço tratado (FT10%), demonstrando que a elevação na porcentagem da farinha tratada na dieta propiciou o aumento dos fenólicos totais ingeridos, sendo essa superior à dieta contendo a farinha do resíduo bruto a 1%. Entretanto, o grupo com maior consumo (FT10%) teve a maior quantidade excretada nas fezes de fenólicos (44

m), diferindo estatisticamente das demais, o que sugere uma mudança na coloração das fezes, conforme observado na Figura 2. Isso pode indicar algum grau de saturação no processo absorptivo em âmbito intestinal, dose dependente, como observado por Tripoli et al. (2004).

Pela digestibilidade fenólica verifica-se que as dietas contendo a farinha do bagaço de azeitonas apresentaram um aproveitamento dos fenólicos pelo organismo dos animais, com variação entre 73% e 84%. Esses dados sugerem que, aumentando o teor de fenólicos consumidos, apesar de aumentar a quantidade presente nas fezes, uma parcela ainda é absorvida pelo organismo.

C+



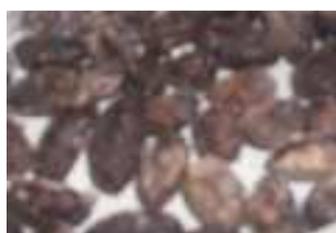
FT 5%



C-



FT 10%



FT 1%



FB 1%



Figura 2 Fezes de ratos Wistar alimentados com diferentes dietas

C+ = controle positivo (Dieta AIN – 93M); C- = controle negativo (dieta indutora da elevação do colesterol); FT1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT5% = 5% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT10% = 10% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FB1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas bruto

Os compostos fenólicos são absorvidos de forma dose-dependente e cerca de 98% são metabolizados (SUÁREZ et al., 2011). Contudo, a absorção dos polifenóis pode ser afetada de forma direta ou indireta pela dieta ingerida, sendo diretamente por sofrer interações com alguns componentes do alimento,

tal como a ligação a proteínas e polissacarídeos e indiretamente, por vários parâmetros da fisiologia intestinal (pH, fermentações, excreção biliar e tempo de trânsito). Além disso, as enzimas e os transportadores envolvidos na absorção e no metabolismo de polifenóis também podem ser induzidas ou inibidas pela presença de alguns micronutrientes ou xenobióticos. Tem-se, ainda, o papel da microbiota intestinal, já que os polifenóis não absorvidos no intestino delgado podem ser metabolizados no cólon, resultando em compostos absorvíveis (MANACH et al., 2004).

Os fenólicos presentes nas azeitonas, azeites e seu respectivo resíduo podem sofrer transformações devido a algumas variáveis, o que implicará no aumento ou na redução desses compostos e assim afetará sua capacidade antioxidante, como a acidez, que provoca hidrólise na estrutura da oleuropeína, formando hidroxitirosol e os ligstrosídeos em tirosol. Em animais, pela acidez gástrica, isso também ocorre e estudos em ratos mostram que tais metabólitos são bem absorvidos no jejuno e íleo (CORNWELL; MA, 2008). A absorção é confirmada pela recuperação de tirosol e hitroxitirosol na urina, após a ingestão de fenóis do azeite de oliva (VISSERS; ZOCK; KATAN, 2004).

Cornwell e Ma (2008) observaram que, nos animais alimentados com grandes quantidades de azeite, os produtos da hidrólise da oleuropeína estavam aumentados no plasma e foram rapidamente excretados na urina em grande parte como o glucoronídeo, mas também como sulfo e outros conjugados.

Saura-Calixto (2006) considera que, apesar da baixa biodisponibilidade dos compostos fenólicos, efeitos metabólicos significativos podem ser esperados devido à elevada ingestão e à capacidade antioxidante. Já Kountouri et al. (2007), efetuando a investigação de compostos fenólicos no plasma e na urina de voluntários saudáveis após a ingestão de azeitonas, concluíram que seu consumo leva ao aumento desses compostos no plasma e do potencial antioxidante, ou seja, constataram que os compostos fenólicos são extensivamente metabolizados

pelo organismo humano e aparecem nos fluidos biológicos, principalmente na forma de glucoronídeos (conjugados com ácido glicurônico). Dos 15 compostos fenólicos detectados nas azeitonas, 7 (tirosol, hitroxitirosol e seus possíveis metabólitos) estavam aumentados nos fluidos biológicos após administração.

Serra et al. (2012), avaliando em ratos a biodisponibilidade, o metabolismo e a distribuição de compostos fenólicos do extrato do resíduo da extração do azeite de oliva, constataram que, após uma única ingestão desses compostos, eles foram absorvidos, metabolizados e distribuídos através do fluxo sanguíneo para praticamente todas as partes do corpo, mesmo através da barreira hemocefálica.

O maior valor obtido para o peso das fezes, em relação aos controles, C+ e C-, foi para o grupo com porcentagem mais alta da farinha (FT 10%), porém, este não diferiu estatisticamente dos grupos FT5% e FB1%. Isso pode ser devido ao conteúdo de fibras que, em uma concentração de farinha a 10%, foi capaz de elevar o peso das fezes de forma significativa. Tal característica é atribuída, sobretudo, à fibra insolúvel.

3.4 Análise da glicose capilar caudal, lipidograma e aminotransferases séricas

Na Tabela 5 constata-se as análises da glicemia capilar caudal, lipídios séricos e das aminotransferases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) de ratos Wistar submetidos a seis diferentes dietas.

Tabela 5 Valores de glicose capilar caudal, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-c, triacilglicerol e aminotransferases (AST e ALT) séricas de jejum de ratos Wistar submetidos a diferentes dietas

Parâmetros	Grupos					
	C+	C-	FT1%	FT5%	FT10%	FB1%
Glicose capilar caudal (m. dL ⁻¹)	88,00±7,92b	92,00±14,22ab	106,86±7,20ab	109,17±16,36a	100,29±10,48ab	106,57±15,76ab
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	69,57±10,37b	75,77±15,16b	114,33±24,05a	111,71±14,93a	113,22±23,73a	108,69±15,66a
LDL-C (mg.dL ⁻¹)	28,32±4,16b	48,78±9,88b	81,25±22,03a	79,11±9,39a	87,94±29,29a	85,13±14,50a
HDL-C (mg.dL ⁻¹)	30,29±4,46a	17,86±4,06c	23,84±3,06b	20,59±4,11bc	16,79±2,45c	17,24±2,44c
VLDL-C (mg.dL ⁻¹)	11,02±1,38a	7,56±2,07bc	9,27±1,35ab	7,84±2,13bc	6,86±1,45bc	6,18±0,79c
Triacilglicerol (mg.dL ⁻¹)	55,10±6,88a	37,81±10,37bc	46,35±6,76ab	39,20±10,63bc	34,29±7,27bc	30,90±3,93c
AST (U.L ⁻¹)	235,94±40,51a	235,18±56,19a	206,57±25,03ab	220,71±60,99ab	187,31±38,77ab	149,94±37,13b
ALT (U.L ⁻¹)	33,16±3,57b	69,39±14,76ab	62,29±20,25ab	78,02±41,71a	68,33±19,31ab	49,39±18,82ab

AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

C+ = controle positivo (Dieta AIN – 93M); C- = controle negativo (dieta indutora da elevação do colesterol); FT1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT5% = 5% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT10% = 10% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FB1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas bruto

Os grupos de animais experimentais que foram submetidos às dietas indutoras da elevação do colesterol tiveram valores aumentados da glicemia capilar caudal, porém, somente o grupo FT5% diferiu estatisticamente do padrão (C+). Isso indica que os compostos fenólicos e/ou as fibras presentes nessas dietas, por meio da inclusão da farinha do resíduo da extração do azeite de oliva, podem não exercer efeitos sobre a glicemia.

A relação entre o conteúdo de fenólicos da farinha do resíduo da extração do azeite de oliva e o controle glicêmico é demonstrada pela pesquisa de Loizzo et al. (2011) que, em estudo *in vitro* com o azeite de oliva extravirgem verificaram o efeito hipoglicemiante dos compostos fenólicos por atuarem em âmbito pós-prandial, inibindo as enzimas digestivas, α -glicosidases e α -amilases. Jemai, Feki e Sayadi (2009) constataram, no estudo *in vivo* com ratos Wistar utilizando o extrato das folhas da oliveira, ricos nos compostos fenólicos, oleuropeína e hidroxitirosol, o efeito hipoglicemiante dos fenólicos, por atuação no estímulo da síntese de glicogênio no fígado e na restauração do sistema de defesa antioxidante, evitando o estresse oxidativo. Além disso, tais compostos têm sido implicados no efeito protetor das complicações do diabetes por atuarem também inibindo o processo de glicação e a formação de seus produtos finais que ocorre quando a glicemia está muito elevada, como sugere o estudo de Kontogianni et al. (2013), utilizando extratos das folhas das olivas. Porém, esse efeito é assegurado, principalmente, ao composto fenólico, luteolina.

Os grupos que receberam as dietas contendo a farinha do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva, independentemente da concentração, tiveram os maiores valores para o colesterol total, com aumentos variando de 56% a 64%, em relação ao grupo controle, C+. Contudo, o grupo C- não diferiu do C+. Esperava-se que o grupo C- tivesse uma elevação do colesterol superior ao grupo padrão (C+), por ter recebido uma dieta suplementada com 0,7% de colesterol e 0,1% de ácido cólico, que melhora a absorção do colesterol

dietético, além de terem sido introduzidos 4% da gordura vegetal hidrogenada, rica em ácidos graxos trans, responsáveis por elevarem o colesterol sérico. O perfil dietético comumente usado na indução da hipercolesterolemia em ratos é muito variável. Yokozawa et al. (2006) utilizaram 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico; Kamesh e Sumathi (2012) empregaram 4% de colesterol e 1% de ácido cólico, por 45 dias; Ramadan (2012) utilizou 1% de colesterol e 0,25% de ácido cólico por 60 dias, assim como Jemai et al. (2008), porém, por um período de 112 dias.

A adição na dieta de farinha do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva não teve efeito positivo sobre o colesterol total plasmático, indicando que seus componentes, sobretudo os fenólicos, não foram capazes de prevenir a elevação do colesterol sérico induzida pela dieta. Isso também é evidenciado pela concentração da LDL-c, que seguiu o mesmo padrão de resultados que o colesterol total, ou seja, os grupos com a introdução da farinha apresentaram valores significativamente mais elevados em relação ao controle (C+), o que constitui um ponto negativo, já que o aumento da LDL-c no plasma é considerado fator de risco para doenças cardiovasculares, uma vez que aumenta a chance de sua oxidação e, assim, a formação das placas ateroscleróticas (KAMESH, SUMATHI, 2012). Apesar disso, em alguns estudos menciona-se que a presença de antioxidantes na circulação sanguínea, tanto quantitativo quanto qualitativamente, pode impedir o processo de oxidação da LDL-c, uma vez que atuam como antioxidantes primários, mantendo a saúde cardiovascular (KAMESH; SUMATHI, 2012).

Os valores da HDL-c foram significativamente mais baixos nos grupos com dieta indutora da elevação do colesterol, independentemente da introdução da farinha do resíduo. O teor mais baixo, em relação ao padrão (C+), foi para o grupo com 10% da farinha tratada (FT10%), que não diferiu estatisticamente dos grupos FB1%, FT5% e C-. Esses dados são considerados indesejáveis, já que a

HDL-c elevada exerce efeito cardioprotetor por seu papel no transporte reverso do colesterol, efeito nas células endoteliais e sua atividade antioxidante. Sugere-se que os fenólicos, os ácidos graxos monoinsaturados e as fibras presentes no bagaço de azeitonas, além de não terem exercido efeito hipolipidêmico, não foram capazes de elevar os níveis da lipoproteína HDL-c.

Analisando-se os valores séricos dos triacilgliceróis (TAG) e VLDL-c, evidenciam-se valores mais baixos para a dieta contendo a farinha do bagaço de azeitona bruto a 1%, em relação à dieta controle (C+). O uso de dieta indutora da elevação do colesterol obteve níveis mais baixos de TAG e VLDL, em relação à dieta controle (C+), indicando que o perfil lipídico da dieta, rico em ácido graxos trans e colesterol, promoveu a redução, abaixo do considerado normal (C+), do nível de TAG e VLDL.

Portanto, evidencia-se, com os dados experimentais, que os fenólicos presentes na farinha oriunda do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva e introduzida na dieta rica em colesterol e ácidos graxos do tipo trans não foram eficazes na prevenção da elevação do colesterol sérico, o que é confirmado pela pesquisa de Kamesh e Sumathi (2012) que mencionam que esses compostos são responsáveis pela ação antioxidante, prevenindo a oxidação da LDL-c, e não hipolipidêmico. Contudo, ao contrário do observado, outros estudos têm focado a atenção na atuação dos polifenólicos contidos no azeite virgem sobre o metabolismo do colesterol, e tem sido demonstrado que a atividade da HMG-CoA redutase é significativamente diminuída nos microsomas de fígado de ratos recebendo tais compostos. Porém, mais estudos são necessários para testar em qual concentração esses polifenóis são capazes de provocar essa resposta terapêutica (TRIPOLI et al., 2004).

Os compostos fenólicos têm sido relatados na prevenção da oxidação da LDL-c *in vitro* e mostrado marcada atividade hipolipidêmica *in vivo*, sugerindo a eficácia deles na prevenção e no tratamento de aterosclerose. No caso do azeite

de oliva, seus resíduos e as folhas das oliveiras, o foco tem sido no hitroxitirosol, que tem apresentado potente atividade antioxidante contra os radicais superóxido e hidroxil, sendo mais ativo que as vitaminas antioxidantes e os antioxidantes sintéticos. Porém, é de natureza química muito instável, o que resulta em uma menor eficiência. Esse fato pode explicar, em parte, os resultados não favoráveis obtidos nesta pesquisa, pois o processamento do resíduo pode ter ocasionado perdas significantes desse composto, já que alguns estudos demonstram o hitroxitirosol exercendo efeito hipocolesterolêmico (YOKOZAWA et al., 2006).

Jemai, Feki e Sayadi (2009), ao avaliarem extratos da folha de oliva, evidenciaram que os compostos fenólicos, oleuropeína e hitroxitirosol, foram capazes de reduzir significativamente o colesterol total sérico de ratos diabéticos, revertendo a hipercolesterolemia associada ao diabetes mellitus. Jemai et al. (2008), em estudo com ratos Wistar recebendo dieta rica em colesterol e o hitroxitirosol purificado de folhas de oliva, dissolvido na água de beber (3 mg/kg de peso corporal), constataram que os ratos que receberam uma administração oral de hidroxitirosol tinham menores concentrações de colesterol total, triacilglicerídeos e LDL-c e aumento do HDL-c que aqueles que receberam a dieta rica em colesterol sem a administração oral do composto fenólico relatado, sendo capaz de restaurar o perfil lipídico ao nível do encontrado no grupo controle, com dieta padrão.

Pelos dados da aminotransferase, AST (Tabela 5), constata-se que, com exceção do grupo FB1%, que obteve o menor valor, os demais não apresentaram diferença significativa do grupo padrão (C+). Por esse parâmetro, tanto o tratamento para elevação do colesterol quanto a introdução da farinha do resíduo não implicaram em surgimento de lesão hepática. Ao contrário, o uso da farinha pura propiciou níveis menores que o grupo padrão. Contudo, essa transaminase não é específica do fígado, podendo também ser encontrada nos músculos e no

coração. Pela ALT verifica-se nível elevado para o grupo FT5%, que diferiu significativamente do grupo C+. Os demais grupos não houve diferença em relação a esse grupo. Por ser essa transaminase específica do fígado, sugere-se presença de lesão hepática no grupo que recebeu a dieta indutora da elevação do colesterol com a farinha do resíduo a 5%. Contudo, a ausência de alterações na AST e ALT não descarta doenças do fígado.

Ao contrário do observado neste estudo, Ramadan (2012) e Yokozawa et al. (2006) encontraram níveis de AST e ALT marcadamente mais elevados em ratos hiperlipidêmicos que nos animais do grupo controle.

3.5 Peso do fígado e histologia hepática dos ratos Wistar

Na Tabela 6 evidenciam-se as análises do peso do fígado de ratos Wistar submetidos a seis diferentes dietas.

Tabela 6 Peso do fígado, peso do fígado/peso corporal total, de ratos *Wistar* submetidos a diferentes dietas

Parâmetros	Grupos					
	C+	C-	FT1%	FT5%	FT10%	FB1%
Peso do fígado (g)	11,14±1,48b	17,81±3,33a (59,87%)	18,54±2,45a (66,43%)	18,83±3,17a (69,03%)	17,10±3,11a (53,50%)	18,08±4,47a (62,30%)
Peso do fígado/peso corporal (%)	2,81±0,18b	4,65±0,74a	4,88±0,54a	4,90±0,59a	4,50±0,35a	4,51±0,77a

Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Valores entre parênteses correspondem à porcentagem de aumento do fígado em relação ao grupo controle (C+)

C+ = controle positivo (Dieta AIN – 93M); C- = controle negativo (dieta indutora da elevação do colesterol); FT1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT5% = 5% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FT10% = 10% de farinha do bagaço de azeitonas tratado; FB1% = 1% de farinha do bagaço de azeitonas bruto

Observam-se, na Tabela 6, valores aumentados para os grupos que receberam dieta indutora da elevação do colesterol, mesmo com a introdução da farinha do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva, diferindo significativamente do grupo com dieta padrão (C+). Isso sugere que a dieta indutora da elevação do colesterol, independente da introdução da farinha do bagaço de azeitonas, provocou alteração hepática, característica de esteatose, observada pela histologia (Figura 3), devido ao fato de o acúmulo lipídico ter ultrapassado o normal de 10% do peso do órgão (LUPSOR; BADEA, 2005), apresentando variação de 53,50% a 69,03% no peso em relação ao controle (C+). A dieta de indução da elevação do colesterol tende a propiciar o aumento do peso do fígado pelo acúmulo de lipídios. Em contraste com o seu efeito inibidor sobre a biossíntese do colesterol, o colesterol da dieta tem mostrado estimular a biossíntese de ácidos graxos hepáticos e a incorporação desses nos triacilglicerídeos. Assim, verifica-se que os compostos presentes na farinha, sobretudo os fenólicos, não foram capazes de evitar o acúmulo lipídico no fígado, diferindo do estudo de Jemai et al. (2008), em que os grupos de ratos com dieta elevada em colesterol, que receberam hidroxitirosol purificado, obtido da folha da oliveira, tiveram uma diminuição do peso do fígado, levando-os a concluir que estes polifenóis podem reduzir o acúmulo de lipídios no fígado.

Na Figura 3 tem-se uma análise descritiva da histologia hepática de ratos Wistar submetidos a seis diferentes dietas.

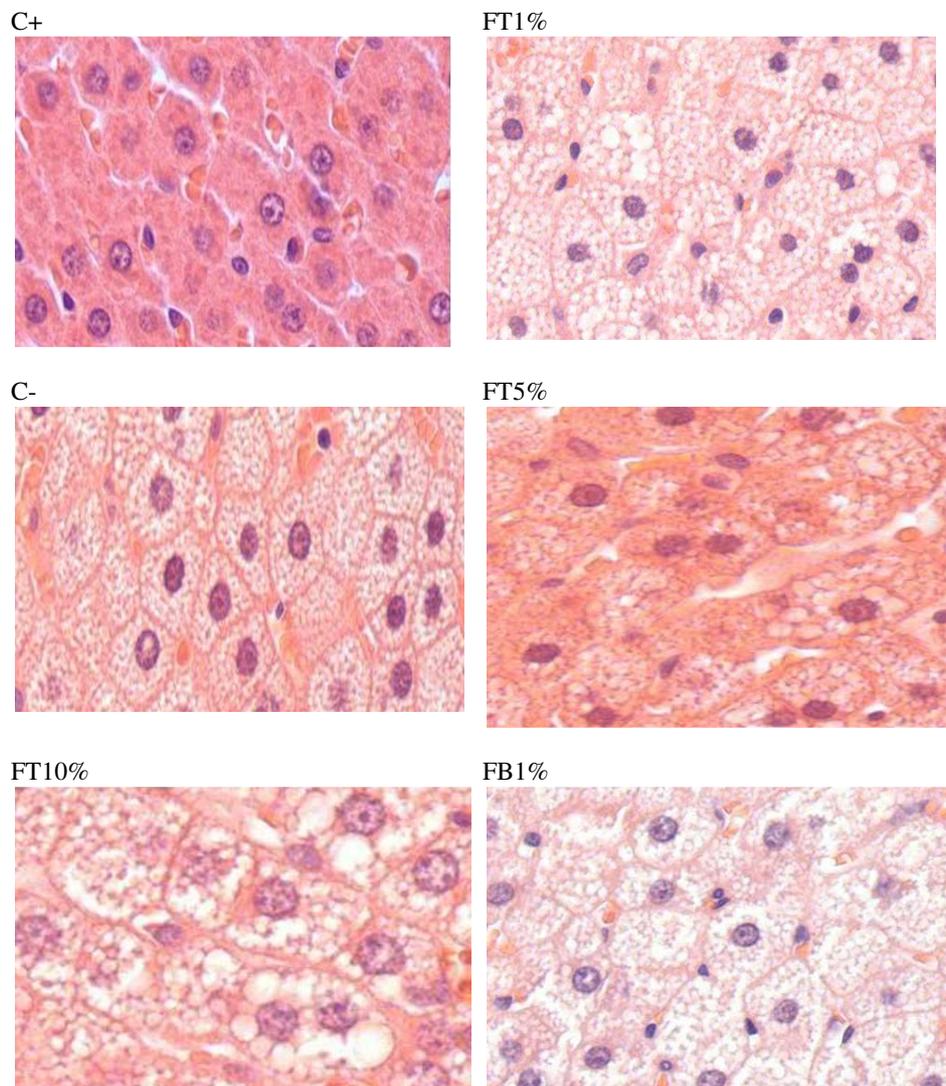


Figura 3 Parênquima hepático de ratos *Wistar* alimentados com diferentes dietas indicando, pelos espaços em branco no citoplasma, presença de inclusões lipídicas. Coloração (H&E), aumento 40X, *Zoom 2,0*

Pela histologia hepática observa-se que os ratos alimentados com a dieta padrão (C+) apresentam uma arquitetura celular mais intacta e em todos os demais grupos, em que se utilizou uma dieta indutora da elevação do colesterol, constata-se uma ampla deposição lipídica, caracterizando como alterações microvesiculares, que podem ser vistas como numerosas inclusões que preenchem o citoplasma do hepatócito de forma desorganizada (LUPSOR; BADEA, 2005), o que pode sugerir presença de esteatose com hepatócitos aumentados. Essa alteração provoca aumento do órgão, evidenciado nos dados obtidos na Tabela 6. Esse exame complementa os dados obtidos nas análises anteriores, relacionando diretamente o tipo de dieta com a elevação do colesterol sérico, o aumento do fígado e a presença de lesões nesse órgão.

4 CONCLUSÃO

A introdução das farinhas obtidas do bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva, bruto e tratado, não propiciou alterações significativas no consumo alimentar e no desenvolvimento ponderal dos ratos, durante o período em que foram utilizadas.

A adição de farinhas de bagaço de azeitonas eleva o aporte fenólico consumido, o que pode contribuir para o aumento na capacidade antioxidante no plasma.

As farinhas utilizadas nas dietas apresentaram alta digestibilidade lipídica e fenólica.

A farinha com maior conteúdo em fenólicos totais (FT10%) foi a que apresentou maior perda desses compostos nas fezes, o que pode ter contribuído na obtenção de fezes mais escuras.

Os grupos de animais que foram submetidos às dietas indutoras da elevação do colesterol não apresentaram diferença estatística em relação ao controle C+.

Mesmo os grupos de ratos que receberam na dieta indutora da elevação do colesterol a introdução da farinha do bagaço de azeitonas, observaram-se elevado teor de CT, LDL-c e redução da HDL-c. O grupo com introdução da farinha a 1% não diferiu estatisticamente em relação ao TAG e VLDL-c do grupo controle C+.

Pelas análises das transaminases, somente foi evidenciado nível elevado quanto à ALT para o grupo que recebeu a dieta indutora da elevação do colesterol, com introdução de 5% da farinha do resíduo.

As análises do peso e histologia hepática revelam acúmulo de lipídios em todos os grupos que receberam a dieta indutora da elevação do colesterol sérico, mesmo com a introdução da farinha do resíduo.

Assim, os fenólicos contidos no bagaço de azeitonas da extração do azeite de oliva, apesar de ter apresentado bom aproveitamento pelo organismo, não foram eficazes na prevenção da elevação do colesterol sérico e das alterações hepáticas vinculadas a esse processo.

REFERÊNCIAS

ALBURQUERQUE, J. A. et al. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, n. 2, p. 195-200, Jan. 2004.

ALMEIDA, M. E. de. **Perfil lipídico e morfologia hepática, aórtica e cardíaca de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas**. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. Washington, 1990. 1094 p.

CARREGARO, A. B.; CASTRO, M. B.; MARTINS, F. S. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 191-195, 2005.

CORNWELL, D. G.; MA, J. Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 19, p. 8774-8786, Sept. 2008.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

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

HEREDIA, F. P. de et al. Effect of dehydroepiandrosterone on protein and fat digestibility, body protein and muscular composition in high-fat-diet-fed old rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 97, n. 3, p. 464-470, Mar. 2007.

INAREJOS-GARCÍA, A. M. et al. PDO virgin olive oil quality-minor components and organoleptic evaluation. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 8, p. 2138-2146, Oct. 2010.

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

JEMAI, H.; FEKI, A.; SAYADI, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 19, p. 8798-8804, Sept. 2009.

KAMESH, V.; SUMATHI, T. Antihypercholesterolemic effect of *Bacopa monniera* linn. on high cholesterol diet induced hypercholesterolemia in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Canberra, v. 5, n. 12, p. 949-955, Dec. 2012.

KONTOGIANNI, V. G. et al. Olive leaf extracts are a natural source of advanced glycation end product inhibitors. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 16, n. 9, p. 817-822, 2013.

KOUNTOURI, A. M. et al. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, n. 10, p. 659-667, Oct. 2007.

LAFKA, T. I. et al. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. **Food Chemistry**, London, v. 12, n. 1, p. 92-98, Mar. 2011.

LOIZZO, M. R. et al. Inhibitory activity of phenolic compounds from extra virgin olive oils on the enzymes involved in diabetes, obesity and hypertension. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 35, n. 2, p. 381-399, Apr. 2011.

LUPSOR, M.; BADEA, R. Imaging diagnosis and quantification of hepatic steatosis: is it an accepted alternative to needle biopsy? **Romanian Journal of Gastroenterology**, Cluj, v. 14, p. 419-425, Dec. 2005.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MENZ, G.; VRIESEKOOOP, F. Physical and chemical changes during the maturation of gordal sevilla olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 8, p. 4934-4938, Mar. 2010.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, London, v. 41, n. 1, p. 111-119, Jan. 2007.

OBIED, H. K.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 1, p. 171-178, Nov. 2008.

PAIVA, F. P. de; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. 28 p.

PELLET, P. L.; YOUNG, V. R. **Nutritional evaluation of protein foods**: report of working group sponsored by the International Union of Nutritional Sciences and United Nations World Hunger Programme. Tokyo: The United Nations University, 1980. 153 p.

RAMADAN, M. F. Physalis peruviana pomace suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 63, n. 4, p. 411-422, oct./dic. 2012.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on The reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov. 1993.

RODRIGUES, C. I. et al. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 5, p. 440-448, Aug. 2007.

SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 6, p. 442-447, Feb. 2006.

SERRA, A. et al. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 3, p. 486-496, Mar. 2012.

SUAREZ, M. et al. Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 106, n. 11, p. 1691-1701, Dec. 2011.

VISSERS, M. N.; ZOCK, P. L.; KATAN, M. B. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 58, n. 6, p. 955-965, June 2004.

VERA, R. et al. Feeding dry olive cake modifies subcutaneous fat composition in lambs, noting cake resistance to degradation and peroxidation. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 69, n. 4, p. 548-559, 2009.

VISSERS, M. N.; ZOCK, P. L.; KATAN, M. B. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 58, n. 6, p. 955-965, June 2004.

WATERHOUSE, A. L. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Currente protocols in food analytical chemistry**. New York: J. Wiley, 2002. p. 11-18.

YOKOZAWA, T. et al. The protective role of chinese prescription kangen-karyu extract on diet-induced hypercholesterolemia in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 4, p. 760-765, 2006.

ANEXO

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras referente ao projeto de pesquisa “Resíduo da extração do azeite de oliva de Minas Gerais: caracterização química, *in vivo* e sensorial visando o consumo humano”.

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufpa.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 030/11, relativo ao projeto intitulado “Resíduo da extração do azeite de oliva de minas gerais: caracterização química, “in vivo” e sensorial visando o consumo humano”, que tem como responsável **Maria de Fátima Piccolo Barcelos**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 24/11/2011.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 030/11, related to the project entitled “Residue extraction of olive oil from Minas Gerais: chemical, “in vivo” and sensory characterization seeking human consumption.”, under the supervision of **Maria de Fátima Piccolo Barcelos**, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, and was approved in **November 24, 2011**.

Lavras, 24 de novembro de 2011.


Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente em exercício da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufpa.br - www.prp.ufpa.br