

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA CAMPOS DE CARVALHO

**BIOATIVIDADES DE RESÍDUO AGRÍCOLA DA PRODUÇÃO DE AZEITE DE
OLIVA DO RIO GRANDE DO SUL E POSSÍVEIS APLICAÇÕES**

Porto Alegre

2018

ANA CAMPOS DE CARVALHO

**BIOATIVIDADES DE RESÍDUO AGRÍCOLA DA PRODUÇÃO DE AZEITE DE
OLIVA DO RIO GRANDE DO SUL E POSSÍVEIS APLICAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

Co-orientadora: Dra. Anna Carolina Yendo

Porto Alegre

2018

RESUMO

Olea europaea é a única espécie da família Oleaceae que possui frutos comestíveis a partir dos quais são produzidas importantes *commodities* internacionais, dentre elas o azeite de oliva. No processo de produção é gerada uma grande quantidade de resíduo líquido, o qual compartilha com o fruto da planta sua composição química, como a presença de compostos fenólicos com alto potencial bioativo. Dentre as possíveis utilizações do resíduo líquido da produção de azeite de oliva virgem na indústria estão atividades de deterrência (ação anti-herbívoros), fitotoxicidade (bioherbicidas), como substitutos mais sustentáveis dos insumos agrícolas, e antioxidantes de interesse farmacêutico e cosmético. As possibilidades de uso deste subproduto da produção de azeite representam uma linha de investigação relevante, pois, além do possível uso em novos produtos, atualmente esta biomassa também é descartada de forma empírica. Sendo assim, este estudo se propôs a investigar o efeito de diferentes concentrações de resíduo líquido da produção do azeite de oliva como possível deterrente de um gastrópode herbívoro generalista, bem como seu efeito na germinação, crescimento, e teor de clorofila de plantas cultivadas em sua fase jovem. Não foi observada atividade deterrente do resíduo líquido, o que pode refletir diferenças no perfil químico determinante desta atividade em frutos comparativamente a folhas. Já na quantificação de clorofila, o resíduo líquido menos concentrado (25%) resultou em menor teor de clorofila em plantas de milho. Na mesma espécie, ocorreram alterações no desenvolvimento. O resíduo líquido se mostrou eficiente na inibição da germinação, tanto em milho quanto em alface. Além disso, mostrou alta atividade antioxidante contra peróxido e superóxido nos experimentos realizados. Sendo assim, foi evidenciado que o resíduo agrícola em tela possui ingredientes bioativos que podem ser promissores como conservantes, nutracêuticos, ingredientes de cosméticos e de herbicidas naturais, dentre outros. Assim, o estudo das características químicas e biológicas do resíduo líquido da produção de azeite de oliva gaúcha deve ser promovido e o uso potencial do resíduo líquido como produto é promissor.

Palavras chave: *Olea europaea*, azeite de oliva, resíduo agrícola, antioxidante, germinação

ABSTRACT

Olea europaea is the only species of Oleaceae that has edible fruits, from which important international commodities are produced, olive oil among them. In the production process, a large amount of liquid organic residue is generated, which shares chemical composition features with the fruit, such as presence of bioactive phenolic compounds. Among the potential industrial uses of the liquid residue of virgin olive oil production are deterrence of agricultural plagues (anti-herbivory), phytotoxicity (bioherbicides), both of which are sustainable substitutes for conventional agrochemicals, and antioxidants of pharmaceutical and cosmetic interest. The possibilities of the use of this byproduct of the olive oil industry are a relevant line of investigation, since, besides its potential use in new products, the residue is currently disposed of in an empirical manner. Hence, this study investigated the effect of different concentrations of olive mill waste water as potential feeding deterrent against a generalist gastropod herbivore, as well as its impacts on germination, growth, and chlorophyll levels of young cultivated plants. There was no deterrent activity on the gastropod herbivore, which may be due to differences in the chemical profile responsible for this activity in leaves versus fruit. The liquid residue at 25% (v/v) caused reduction in chlorophyll levels of corn plants. In the same species, developmental changes were also detected. The liquid residue was an effective inhibitor of germination in both corn and lettuce. In addition, the liquid residue displayed strong antioxidant activity against peroxide and superoxide. Therefore, it has been shown that olive oil extraction liquid residue could have promising applications in the food industry as preservatives and nutraceuticals, as ingredients in cosmetic and natural herbicidal formulations, among other uses. Therefore, the study of chemical and physical features of the liquid residue of the southern Brazilian olive oil production should be stimulated and its potential as industrial product is highly promising.

Key words: *Olea europaea*, olive oil, agricultural waste, antioxidant, germination

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
1.1	A Oliveira.....	6
1.2	A oliva e o azeite de oliva	7
1.3	Composição química do resíduo da produção de azeite de oliva	8
1.4	Deterrência	9
1.5	Fitotoxicidade.....	9
1.6	Atividade antioxidante	10
2	JUSTIFICATIVA.....	12
3	OBJETIVOS.....	13
4	METODOLOGIA	14
4.1	Fonte de extrato de resíduo de produção de azeite de oliva	14
4.2	Avaliação da atividade deterrente	14
4.3	Avaliação da atividade fitotóxica	14
4.3.1	Material Vegetal	14
4.3.2.	Ensaio de fitotoxicidade no crescimento inicial de plantas	15
4.3.3.	Ensaio de germinação	15
4.4	Avaliação de atividade antioxidante.....	16
4.5	Potencial osmótico	17
4.6	Análise fitoquímica preliminar.....	17
4.7	Análise estatística	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1.	Análise da atividade deterrente	18
5.2.	Avaliação da atividade fitotóxica	18
5.2.1.	Efeitos sobre o crescimento inicial de plantas.....	19
5.2.2.	Ensaio de germinação.....	22
5.3.	Avaliação de atividade antioxidante.....	26
5.3.1.	Localização histoquímica <i>in situ</i> do acúmulo de peróxido de hidrogênio	26
5.3.2.	Localização histoquímica <i>in situ</i> do acúmulo de superóxido.....	26
5.3.3.	Teste <i>in vitro</i> de determinação de liberação de radical superóxido.....	26
5.4.	Análise fitoquímica preliminar.....	27
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	29
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Oliveira

A oliveira (*Olea europaea* Linné) é uma árvore pertencente à família Oleaceae, a qual possui espécies distribuídas em regiões tropicais e temperadas do mundo. A *O. europaea* é a única espécie da família que possui frutos comestíveis. Essa árvore pode alcançar até quinze metros de altura e, seu tronco, medidas de raio superiores aos cem centímetros (BARRANCO et al., 2008). As folhas são simples, persistentes e opostas, de consistência coriácea, margem inteira e podem apresentar formas elípticas ou lanceoladas. A face adaxial é de um tom verde escuro e brilhante devido à presença de cera, já a face abaxial é de coloração prata e coberta de tricomas. A nervura central é bem marcada e as secundárias são pouco visíveis. Possuem pecíolos curtos que chegam a apenas meio centímetro de comprimento (BARONE et al., 1993; CIMATO et al, 1997).

Já as flores são perfeitas e dispostas em inflorescências do tipo panículas axilares, com cor que passa do verde ao branco amarelado. O ovário é súpero bicarpelar e bilocular, o estilete é curto e o estigma bifido, os estames são curtos e opostos com anteras grandes e deiscentes longitudinalmente. A oliva é um fruto do tipo drupa com forma que varia entre elipsoidal e globosa (MOLANO, 2012; SERRALVES, 2018) (Figura 1).

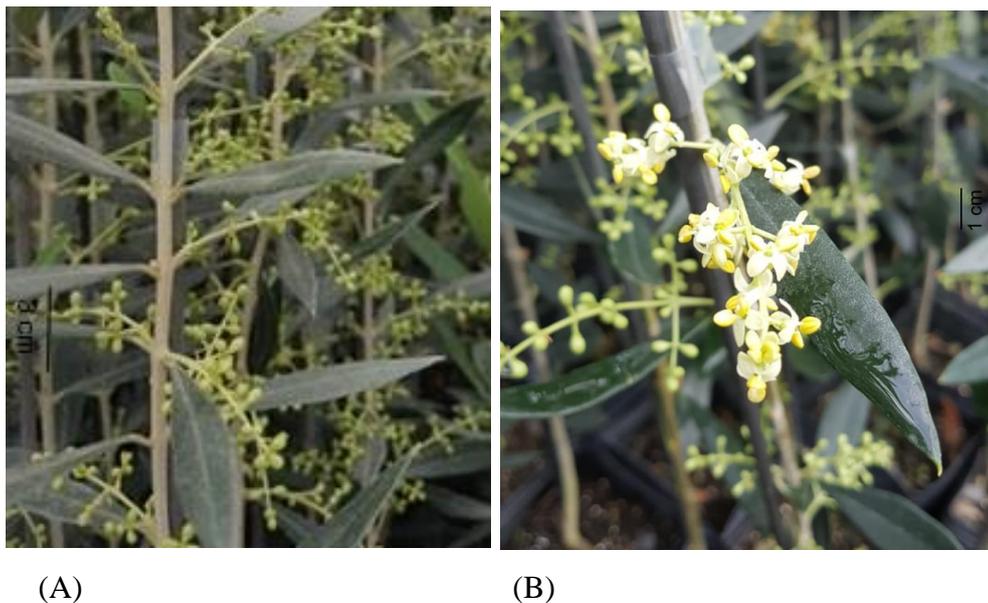


Figura 1. Frutos verdes (A) e flores (B) de *O. europaea* (Fonte: Autora)

1.2 A oliva e o azeite de oliva

O azeite de oliva é um produto extraído do fruto da *O. europaea*. Segundo Brake e colaboradores (2014), seu cultivo começou na bacia do Mediterrâneo há cerca de seis mil anos, estando adaptado ao clima característico da região. A partir desta espécie arbórea são produzidas importantes *commodities* para os mercados mundiais.

Apesar de sua origem - os líderes na produção da azeitona de mesa e do azeite de oliva incluem países como a Espanha, Itália, Tunísia e Grécia (RODEGHIERO, 2016) - a oliva já é produzida em outros locais do mundo, inclusive no Brasil. No país, foi introduzida por imigrantes europeus para consumo próprio, podendo ser encontrada nas regiões Sul e Sudeste nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COUTINHO et al., 2009; EPAMIG, 2006 apud RODEGHIERO, 2016).

As azeitonas contêm cerca de 50% de água, 20% de óleos, 20% de carboidratos (sendo substâncias pécnicas, celulósicas e hemicelulósicas), pigmentos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos e minerais (NAJAFIAN et al., 2009). Sendo assim, apesar de morfologicamente não ser distinta de certos frutos, sua composição química é bastante peculiar (JESUS, 2013).

O azeite de oliva, por sua vez, é definido como o óleo produzido a partir dos frutos das oliveiras, extraído por processos mecânicos e sem tratamentos químicos. A técnica mais utilizada atualmente nas indústrias é um processo contínuo de três fases (gerando azeite, bagaço seco e a água ruça), constituído por: a) colheita - realizada de forma mecânica ou manual; b) recepção - após a colheita não devem permanecer em transporte ou local de processamento (lagar) por mais de 24 horas para evitar modificações nos frutos; c) limpeza - retirada de impurezas; d) lavagem - com água potável para a retirada de sujidades incrustadas; e) moagem - trituração por martelos mecânicos que libera o óleo e forma uma pasta; f) batedura - batimento lento e contínuo com pequeno aquecimento (entre 25 °C e 30 °C) para homogeneização da pasta; g) extração - por decantação (processo mais antigo) ou por centrifugação da massa; h) filtração - quando são retiradas partículas remanescentes (Figura 2) (RODEGHIERO, 2016). Após esse processo, juntamente com a produção do azeite de oliva, há como resultado uma grande quantidade de resíduo agrícola, que corresponde à fase sólida do processo e a fase líquida (aquosa e mais densa que o azeite).

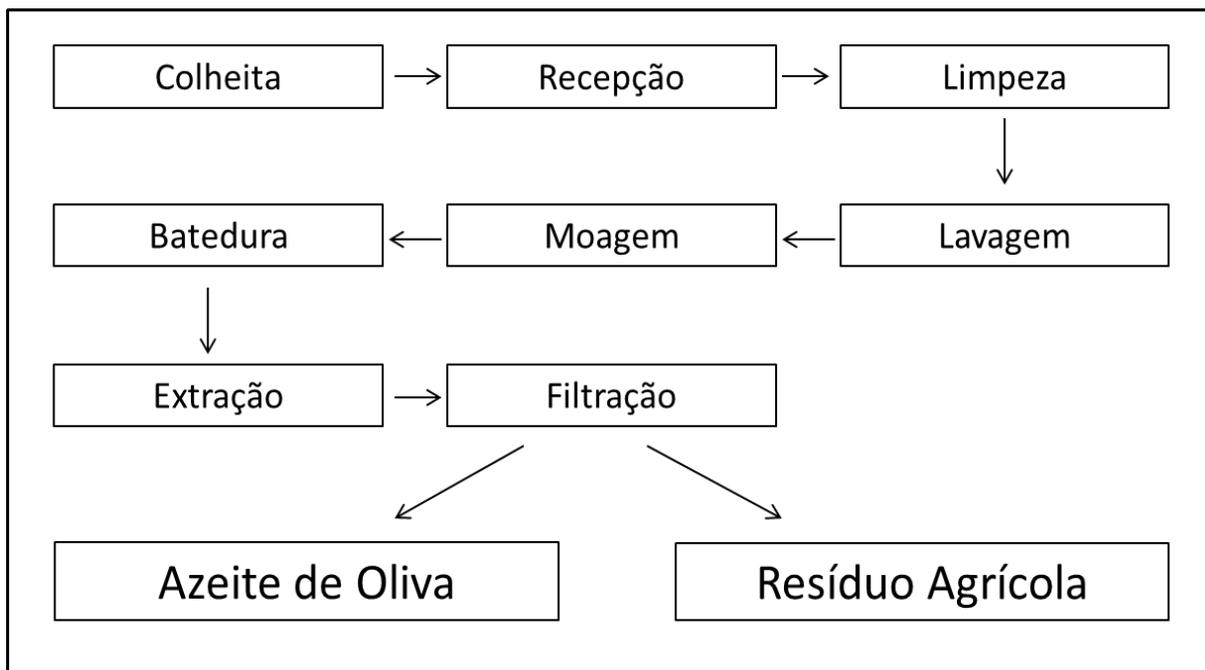


Figura 2. Fluxograma do processo contínuo para extração de azeite de oliva.

1.3 Composição química do resíduo da produção de azeite de oliva

O resíduo orgânico (tanto líquido quanto sólido) da produção de azeite de oliva contém uma grande quantidade de óleo e metabólitos do mesmo, compartilhando em parte a composição química do fruto, bem como potenciais propriedades. Segundo Tasioula-Margari et al. (2015), o azeite de oliva é rico em compostos fenólicos, sendo os mais abundantes derivados da oleuropeína e do ligstrosídeo. Outro indicativo da composição química do resíduo orgânico é a presença nas folhas da oliveira de fenóis simples e ácidos, lignanas, secoiridóides e flavonoides, que incluem flavonas, flavonóis, catequina, fenóis substituídos e oleuropeína, que, assim como no azeite, é o composto mais frequentemente encontrado (ABAZA et al., 2015).

A oleuropeína é predominante nos estágios iniciais da maturação das oliveiras, sendo degradada com o avançar da maturação e resultando no hidroxitirosol, composto fenólico com poderosa atividade antioxidante, além de efeitos nutricionais e imunomoduladores (WANI et al., 2018). Além da utilização do azeite de oliva na promoção da saúde como antioxidante e no tratamento de doenças, estudos revelam que o bagaço da azeitona pode ser utilizado contra patógenos comuns em culturas através de comprovada atividade antifúngica atribuída aos compostos fenólicos presentes (WINKELHAUSEN et al., 2005).

1.4 Deterrência

Os animais considerados pragas são a principal fonte de perda na produção agrícola. Sendo assim, medidas preventivas e corretivas de controle de herbívoros devem ser incorporadas no sistema de produção de culturas para redução das perdas.

Entretanto, a aplicação de pesticidas sintéticos tem consequências, como a contaminação de alimentos, da água subterrânea e do ar, por vezes com resíduos potencialmente carcinogênicos, teratogênicos e/ou tóxicos. Como alternativa, os produtos biológicos de origem vegetal são geralmente mais seguros, convenientes e de menor custo. Há vários estudos com oliveira; entretanto, muitos deles são focados nos metabólitos secundários extraídos das folhas das árvores, que apresentam diversas bioatividades. Nesse contexto, já foram relatadas as atividades inseticida e deterrente do extrato das folhas de oliveira contra *Myzus persicae* e *Phthorimaea operculella*, de modo que o extrato se mostrou efetivo no controle de populações de animais no campo, podendo ser um substitutivo ‘verde’ para os inseticidas utilizados atualmente (HAMOUDA et al., 2015).

No presente estudo, a avaliação da potencial atividade deterrente do resíduo líquido da produção do azeite de oliva foi realizada utilizando caracóis da espécie *Helix aspersa*, já utilizados como biomodelo em diversas investigações em áreas ambientais e fisiológicas. Trata-se de herbívoros detritívoros com ecologia bem descrita, sendo assim de fácil manejo em ambientes controlados. Esses animais se alimentam principalmente de plantas ornamentais, gramíneas e leguminosas. É uma espécie exótica que foi introduzida originalmente de forma voluntária na América do Sul como fonte alternativa de proteína e atualmente representa um problema para hortaliças em ambientes seminaturais e agrícolas (HERNÁNDEZ, 2010).

1.5 Fitotoxicidade

Além da atividade deterrente, é importante ressaltar a possibilidade de o resíduo agrícola possuir fitotoxicidade. Isso se dá porque os seres vivos, principalmente as plantas, produzem substâncias químicas – fenólicos, cumarinas, terpenoides, flavonoides, alcaloides, glicosídeos, taninos e quinonas - como mecanismos de defesa - que podem influenciar, positivamente ou negativamente, outros elementos do ecossistema, como herbívoros ou plantas competidoras (alelopatia) (DE ALMEIDA, 1991). A intensidade do efeito fitotóxico

de um metabólito pode variar entre espécies evolutivamente distantes (p. ex.: mono e dicotiledôneas). A potencial utilização do extrato do resíduo da produção do azeite de oliva como bioherbicida também foi avaliada no presente estudo. Ademais, como atualmente este resíduo é descartado no solo, por vezes o do próprio pomar, essa ação pode interferir na própria produção das oliveiras ou cultivos associados.

1.6 Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são consideradas altamente tóxicas e reativas, causando dano oxidativo às células de todos os seres vivos. Algumas delas são oxigênio singlete, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (MATSUURA, 2012) (Figura 3). Entretanto, em concentrações moderadas, elas podem servir como moléculas sinalizadoras, na resposta hormonal às condições de estresse abiótico e biótico, no controle de morte celular e outros processos celulares, para isso atuando em diversos compartimentos celulares (APEL & HIRT, 2004).

Essas moléculas são produzidas principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias de forma contínua e, geralmente, estão em condição de equilíbrio mantido por um balanço entre a produção e controle de ROS por ação de compostos antioxidantes (APEL & HIRT, 2004). As condições ambientais – através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos - regulam o aprisionamento de ROS e, conseqüentemente, protegem contra níveis elevados dessas moléculas, os quais são gerados por situações de estresse (JANSEN et al. 1998).

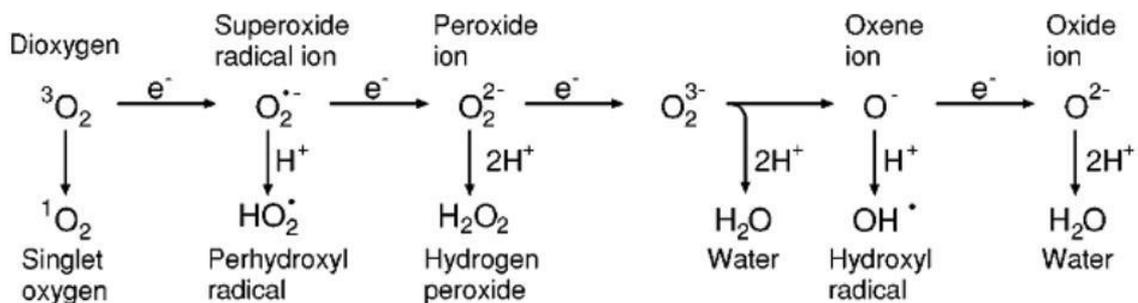


Figura 3. Rota geral de formação de espécies reativas de oxigênio. Fonte: Apel & Hirt (2004).

Muitos compostos vegetais são de interesse humano devido às suas propriedades antioxidantes. Os polifenóis estão amplamente presentes nas plantas e são conhecidos pela

pronunciada função antioxidante. Essa classe de compostos pode ser dividida em diversas subclasses de acordo com a composição do seu núcleo aromático, sendo os flavonoides o maior subgrupo desses compostos e um dos mais eficientes na mitigação de ROS. Alguns minerais essenciais também têm um importante papel no equilíbrio redox. Sendo assim, extratos de plantas estão sendo utilizados no desenvolvimento de produtos de utilidade comercial pois são ricos em compostos bioativos (KUPPUSAMY et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

O resíduo orgânico decorrente da produção do azeite de oliva no Rio Grande do Sul é geralmente descartado no próprio pomar, sem avaliar as consequências desse descarte. Além disso, o potencial para desenvolvimento de novos produtos de interesse comercial em função das características químicas e atividades biológicas das diferentes frações da oliveira não está sendo explorado. Nesse contexto, testar as possibilidades de uso do subproduto líquido da produção de azeite (aqui referido como extrato) representa uma linha de investigação relevante e visando maior sustentabilidade.

3 OBJETIVOS

a) Objetivo geral

Este estudo se propôs a investigar o efeito de diferentes concentrações de resíduo líquido da produção do azeite de oliva (extrato) como possível deterrente de herbívoro generalista, bem como seu efeito na germinação, crescimento, e parâmetros bioquímicos de uma monocotiledônea e uma dicotiledônea cultivadas.

b) Objetivos específicos

- Testar a atividade deterrente contra moluscos do extrato através de experimento com o modelo generalista *Helix aspersa*.
- Avaliar a fitotoxicidade e o potencial alelopático do extrato através de ensaios de crescimento e germinação de uma espécie dicotiledônea, *Lactuca sativa* (alface), e uma monocotiledônea, *Zea mays* (milho).
 - Realizar análise fitoquímica preliminar de compostos presentes no extrato.
 - Avaliar o possível efeito antioxidante do extrato na mitigação de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido.

4 METODOLOGIA

4.1 Fonte de extrato de resíduo de produção de azeite de oliva

O material vegetal residual da produção de azeite de oliva foi gentilmente cedido pela empresa TecnoPlanta (Barra do Ribeiro, RS), proprietária da marca de azeite Prosperato. O material vegetal residual da produção foi obtido da primeira prensagem de azeite virgem, safra de 2017/2018. Logo após a obtenção, esse resíduo foi mantido a -10 graus centígrados até a execução dos ensaios aqui descritos. O resíduo foi filtrado, formando o extrato utilizado neste estudo. As diluições dos extratos foram feitas em água destilada.

4.2 Avaliação da atividade deterrente

Para a avaliação da atividade deterrente, foram realizados ensaios com caramujos da espécie *Helix aspersa* (Stylommatophora: Helicidae), coletados em Porto Alegre, RS, e mantidos até o ensaio em recipiente de vidro transparente em condições de luz e temperatura controladas. Para o experimento, os caramujos foram individualizados em recipientes plásticos transparentes com água ad libitum e privados de alimento por 24 h antes do início do experimento, e mantidos a 18 °C sob um fotoperíodo de 16 h.dia-1 fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas. Os testes foram baseados em protocolo publicado anteriormente (SMITH et al., 2001), com pequenas modificações. Os ensaios foram realizados utilizando um método ‘no choice’, com 8 repetições (animais) por tratamento. Os animais foram separados em quatro grupos e para cada um deles foram oferecidos discos foliares de couve de cultivo orgânico embebidos em 4 soluções: água destilada - controle negativo; solução de ácido tânico 20 mM- controle positivo; e dois tratamentos com diferentes concentrações do extrato - um diluído a 25% (T1) e outro 100% (T2). Os caracóis foram mantidos a 18 °C, com 16 h.dia-1 de fotoperíodo. Após 48 h e 96 h, a área de alimento remanescente foi quantificada através do software ImageJ. A análise estatística da quantidade de alimento consumido foi realizada através do pacote GraphPad Prism versão 8.0.

4.3 Avaliação da atividade fitotóxica

4.3.1 Material Vegetal

Os experimentos de avaliação do efeito fitotóxico do extrato foram realizados com diásporos (cariopses e aquênios, respectivamente, aqui referidos como sementes) de *Zea mays* e *Lactuca sativa*, bem como plântulas das mesmas espécies. Para isso, foram utilizadas sementes comerciais de milho impregnadas superficialmente com antifúngico, o mesmo ocorrendo para sementes de alface (Isla®, lote 116377-001). Para obtenção das plântulas para os ensaios de efeito sobre o crescimento inicial, ambas as sementes (milho e alface) foram germinadas em caixas padronizadas do tipo Gerbox, onde foram acondicionadas duas folhas de papel filtro embebidas com 20 mL de água destilada. Foram dispostos 25 diásporos em cada caixa, que foram mantidos em incubadora B.O.D a 25 °C, no escuro.

As plântulas obtidas após 5 dias foram transferidas para sementeiras contendo substrato autoclavado (substrato terra preta comercial:vermiculita – proporção 1:1; v/v) e mantidas em sala com luz e temperatura controladas ($150 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoper\u00edodo de 16 h.dia⁻¹; 25 + 2 °C).

4.3.2. Ensaios de fitotoxicidade no crescimento inicial de plantas

A avaliação do potencial efeito fitot\u00f3xico do extrato no crescimento de pl\u00e2ntulas de milho e alface foi realizado utilizando replicatas de 25 sementes para cada tratamento. As pl\u00e2ntulas pr\u00e9-germinadas foram expostas ao controle negativo – \u00e1gua destilada -, ao controle positivo – \u00e1cido ac\u00e9tico 0,2 % (para o experimento com milho) e solu\u00e7\u00e3o de cloreto de s\u00f3dio (NaCl) 0,25 M (para o experimento com alface) – e dois tratamentos contendo o extrato do res\u00edduo da produ\u00e7\u00e3o do azeite de oliva (ERO), um a 100 % (T2) e outro dilu\u00eddo a 25% (T2). Para isso, 2 mL da solu\u00e7\u00e3o foram adicionados \u00e0 respectiva c\u00e9lula individual da sementeira. Adicionalmente, a solu\u00e7\u00e3o correspondente foi aspergida at\u00e9 ponto de orvalho nas folhas das pl\u00e2ntulas testadas. Os tratamentos foram mantidos em fotoper\u00edodo de 16 horas de luz com temperatura controlada ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Ap\u00f3s 4 dias, foram avaliados par\u00e2metros de crescimento, como o alongamento de parte a\u00e9rea e raiz, e massa seca. Al\u00e9m disso, foi realizado o doseamento relativo de clorofila por clorofil\u00f4metro (SPAD). Os experimentos compreenderam 25 plantas por tratamento e foram repetidos duas vezes de modo independente para cada esp\u00e9cie de planta germinada.

4.3.3. Ensaios de germina\u00e7\u00e3o

Nos ensaios de germinação, 20 mL de cada uma das soluções correspondentes aos tratamentos foram aplicados em caixas do tipo Gerbox acondicionadas com duas folhas de papel filtro, para milho, e 6 mL em placas de Petri com duas folhas de papel filtro, para alface. Os tratamentos avaliados foram: controle negativo (água destilada), controle positivo (solução de cloreto de sódio 0,25 M), e as duas concentrações do extrato (25% e 100%). Foram dispostas 50 sementes (milho ou alface) para cada tratamento, que foram mantidas em incubadora B.O.D a 25 °C, no escuro.

Foram avaliadas a taxa e a velocidade de germinação - para as duas espécies de plantas (milho e alface) – o comprimento médio de parte aérea, o comprimento médio da raiz, número de raízes secundárias e adventícias (apenas para milho). O índice de velocidade de germinação foi calculado de acordo com Maguire (1962):

$$VG = N1/D + N2/D2 + \dots + Nn/Dn$$

Onde: IVG = índice de velocidade de emergência; N = números de plântulas verificadas no dia da contagem; D = números de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem.

4.4 Avaliação de atividade antioxidante

Para a avaliação de atividade antioxidante, foi utilizado o método de localização histoquímica *in situ* do acúmulo de peróxido de hidrogênio em tecidos vegetais, que utiliza o reagente diaminobenzidina (DAB), o qual reage com o peróxido de hidrogênio produzindo pontos de cor marrom. Também foi realizado o método de localização histoquímica *in situ* do acúmulo de radical superóxido em tecidos vegetais, o qual utiliza o reagente azul de nitrotetrazólio (NBT), que reage com o radical superóxido produzindo pontos de cor azul. Ambos os ensaios foram realizados a partir de protocolo publicado anteriormente (SHI et al., 2010). Além disso, foi realizado teste *in vitro* de determinação de liberação de radical superóxido, no qual a liberação da molécula e sua posterior análise foram realizadas seguindo Zhishen e colaboradores (1999), utilizando NBT para reagir com o radical livre, sofrer redução e formar formazan (produtos cromogênicos artificiais resultados da redução de sais tetrazólio por desidrogenases e redutases) para a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 560 nm. Neste experimento o controle negativo foi considerado como 100 % de liberação deste radical livre, sendo as porcentagens de liberação do radical com os tratamentos e o

controle positivo calculadas a partir dele. Nos três experimentos foi utilizado rutina 5 μ M como controle positivo.

4.5 Potencial osmótico

Para verificação de potencial osmótico do extrato foram cortados cilindros de batata inglesa, pesados, imergidos em solução de cloreto de sódio em diferentes concentrações (0,10; 0,20; 0,15; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,45 e 0,50 mM), em extrato 100% e em água destilada – por 40 minutos -, e pesados novamente para avaliar o ganho ou perda de massa e seu consequente potencial osmótico.

4.6 Análise fitoquímica preliminar

Para a análise fitoquímica preliminar do extrato foram realizados: teste para fenóis e taninos; teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides; testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas; teste para flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas; e teste para confirmação de catequinas. Todos os ensaios qualitativos foram executados segundo protocolos publicados anteriormente (MATOS, 1988).

4.7 Análise estatística

A análise estatística e o desenho dos gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido de pós-teste estatístico apropriado. Para a análise do número de raízes secundárias no experimento de germinação, o qual não atendeu os quesitos paramétricos, foi realizado Kruskal-Wallis.

Para a avaliação do efeito deterrente, foi realizado pré-teste de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para os ensaios de fitotoxicidade e teor de clorofila, também foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, com exceção da análise do peso seco da parte aérea de milho (tanto para fitotoxicidade quanto para germinação), uma vez que foi verificada normalidade dos dados através do test D'Agostino & Pearson.

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão (SEM).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise da atividade deterrente

Apesar de estudos mostrarem que extratos de folhas de *O. europaea* apresentam significativa atividade inseticida e deterrente em *Phthorimaea operculella* e *Myzus persicae* (HAMOUDA et al., 2015), assim como em *Schistocerca gregaria* (BARBOUCHE apud HAMOUDA et al., 2015), a análise do consumo de alimento pela espécie *H. aspersa* não apresentou diferença significativa entre a couve tratada com ambas as concentrações do extrato deste estudo (T1 e T2, 25% e 100%, respectivamente) e o controle negativo (água destilada) (Gráfico 1). Tal resultado divergente do relatado na literatura pode estar ligado ao fato de que os referidos estudos foram realizados com o extrato das folhas de *O. europaea*, e por variações nas concentrações das moléculas responsáveis pela atividade deterrente ligadas à data da coleta, condições de secagem, zona de cultivo, procedimento de extração e cultivar (ABAZA et al., 2015). Por outro lado, um provável efeito não deterrente é interessante do ponto de vista de uma potencial aplicação como bioherbicida, uma vez que não afetaria diretamente a fauna da região de aplicação.

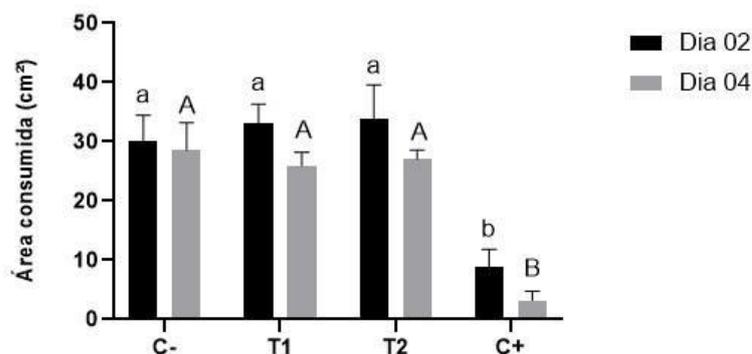


Gráfico 1: Área foliar consumida por *H. aspersa*. O consumo dos discos foliares de couve foi medido nos dias 02 e 04, nos tratamentos C- (água destilada), T1 (extrato diluído a 25%), T2 (extrato 100%) e C+ (ácido tânico 20 mM). Barras representam a média + erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa por teste de Tukey dentro de cada dia de tratamento ($p \leq 0.05$).

5.2. Avaliação da atividade fitotóxica

5.2.1. Efeitos sobre o crescimento inicial de plantas

A quantificação de clorofila nas folhas é um parâmetro importante para estimar a capacidade de absorção de luz por estes órgãos e sua atividade fotossintética. Essa capacidade está diretamente relacionada com o estado nutricional e saúde da planta, ou seja, sua capacidade de assimilação de carbono e estado fisiológico. A análise do teor de clorofila em ambas as espécies de plantas avaliadas não mostrou diferença significativa em comparação com o controle negativo, demonstrando que provavelmente esses tratamentos não afetaram o desenvolvimento da planta, com exceção do tratamento T1 (extrato 25%) em milho, o qual apresentou menor teor de clorofila em comparação ao controle negativo através do método utilizado (SPAD) (Gráfico 2). O efeito negativo de T1 sobre o teor de clorofila em milho pode estar ligado à maior penetração do extrato nesta concentração e a alterações em membranas e enzimas por ação de ácidos fenólicos.

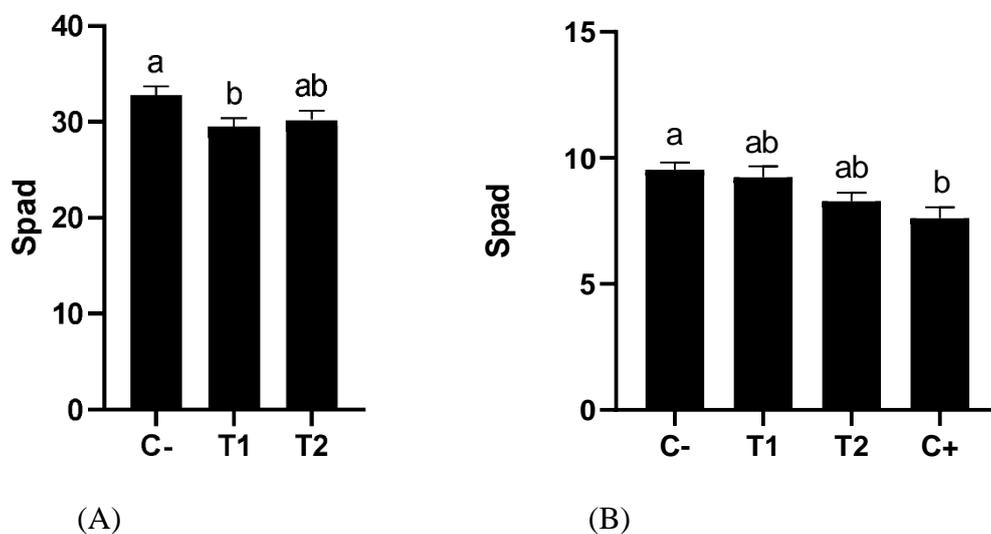
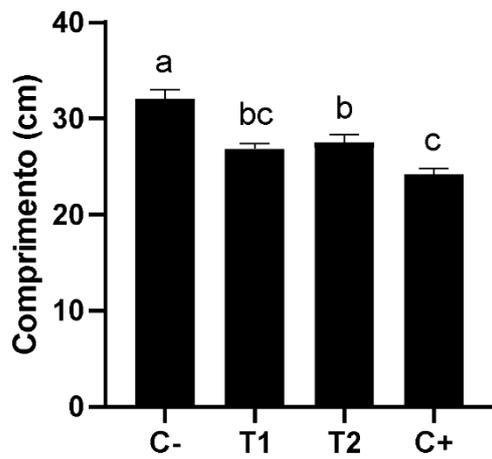


Gráfico 2. Teor de clorofila em milho (A), e alface (B), de plântulas tratadas com água destilada (C-), extrato diluído a 25% (T1), extrato a 100% (T2) e solução de cloreto de sódio 0,25 M (controle positivo para alface, C+) ou ácido acético 0,2 % (controle positivo para milho, C+). Este último controle positivo não aparece no gráfico, pois apresentou 100% de mortalidade no período do ensaio. Barras representam a média + erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa por teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

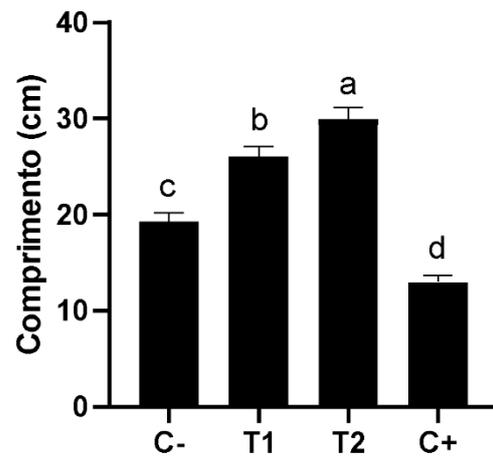
Houve diferença significativa no comprimento de parte aérea e raiz de milho entre os tratamentos e os controles. A parte aérea com exposição aos tratamentos com extrato de oliva sofreu uma diminuição considerável em relação ao controle negativo (Gráfico 3A), o que também pode ser verificado nos resultados obtidos para peso seco (Gráfico 3C). Já as raízes

das plantas de milho expostas a ambos os tratamentos tiveram uma relação inversa a observada na parte aérea, apresentando um crescimento maior do que o encontrado no controle negativo (Gráfico 3B), porém não apresentaram diferença significativa em peso seco (Gráfico 3D). De acordo com a literatura, as raízes de milho suportam melhor o estresse advindo do substrato do que a parte aérea, possivelmente devido ao ajustamento osmótico mais rápido e perda de turgor mais lenta das raízes (SHALHEVET et al., 1995). Ademais, o maior crescimento do sistema radicular pode ter contribuído para a minimização do estresse causado pelo tratamento e controle positivo no substrato em virtude do menor crescimento das partes com elevada capacidade transpiratória (AZEVEDO NETO et al., 1996).

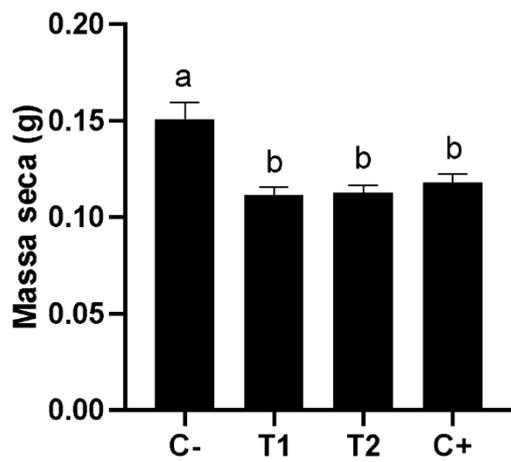
Em contrapartida, não houve diferença significativa nos parâmetros de comprimento de parte aérea e raiz em plântulas de alface entre os quatro tratamentos aplicados, com exceção do crescimento da parte aérea no tratamento com extrato menos concentrado (T1) (Gráficos 4A e 4B), no qual apesar de não se observar diminuição no comprimento do sistema radicular, ocorreu diminuição em massa seca (Gráfico 4D). Entretanto, houve diferença significativa em ambos os tratamentos com relação às medidas de massa seca de parte aérea (Gráfico 4C). Esse resultado pode ser explicado pela morfologia da espécie, já que a planta não tem um crescimento alongado característico (assim como ocorre no milho), sendo mais evidente a deficiência do crescimento em termos de acúmulo de biomassa. Segundo Magiero et al. (2009), mecanismos de absorção, local de ação de substâncias e translocação variam entre as espécies e podem explicar a menor ou maior resistência aos efeitos fitotóxicos e/ou alelopáticos. Estes fatores podem explicar em parte os distintos resultados encontrados entre as plantas de milho e alface. A determinação do potencial osmótico do extrato de oliva também descartou a possibilidade de que esse efeito negativo no desenvolvimento das plantas de milho e alface tenha sido causado por estresse osmótico da solução adicionada, uma vez que a variação de peso das batatas tratadas evidenciou que o extrato possui potencial osmótico pouco negativo, similar à água.



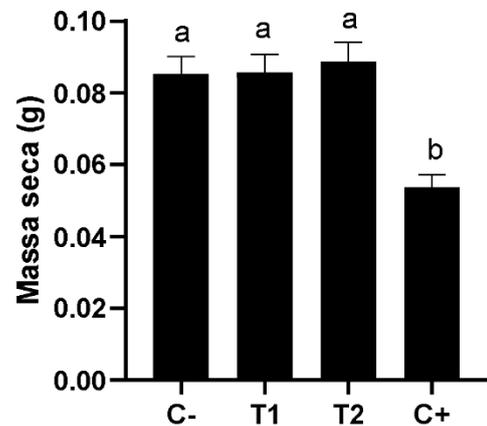
(A)



(B)



(C)



(D)

Gráfico 3: Parâmetros morfológicos e peso seco de plântulas de milho tratadas com água destilada (C-), extrato diluído a 25% (T1), extrato a 100% (T2) e solução de ácido acético 0,2 % (C+). A. comprimento da parte aérea; B. comprimento da raiz; C. peso seco da parte aérea; e D. peso seco da raiz. Barras representam a média + erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa por teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

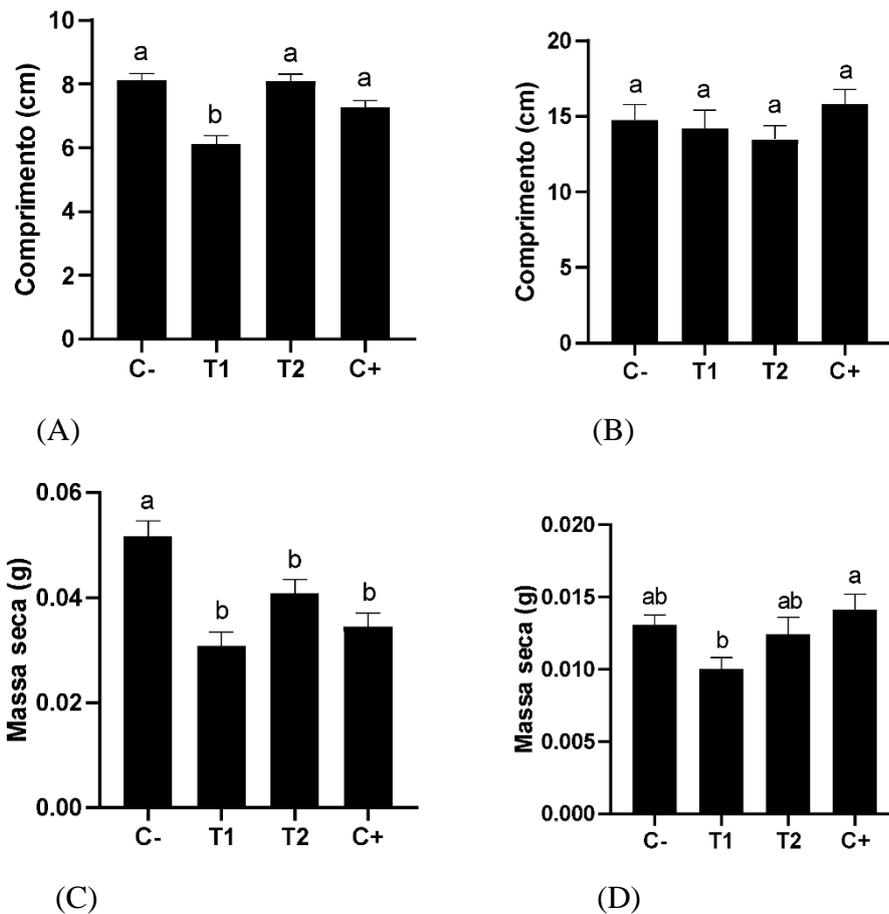


Gráfico 4: Parâmetros morfológicos e peso seco de plântulas de alface tratadas com água destilada (C-), extrato diluído a 25% (T1), extrato a 100% (T2) e solução de ácido acético 0,2 % (C+). A. comprimento da parte aérea; B. comprimento da raiz; C. peso seco da parte aérea; e D. peso seco da raiz. Barras representam a média + erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa por teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

5.2.2. Ensaio de germinação

Nos ensaios de germinação de sementes de milho as taxas do tratamento menos diluído (T1 que corresponde ao extrato diluído a 25 %) foram similares às do controle negativo (C-, água destilada), já o tratamento mais concentrado (T2, 100%) apresentou taxa de germinação menor até que a do controle positivo (C+, solução de cloreto de sódio 0,25 M), afetando de forma expressiva a germinação das sementes de milho.

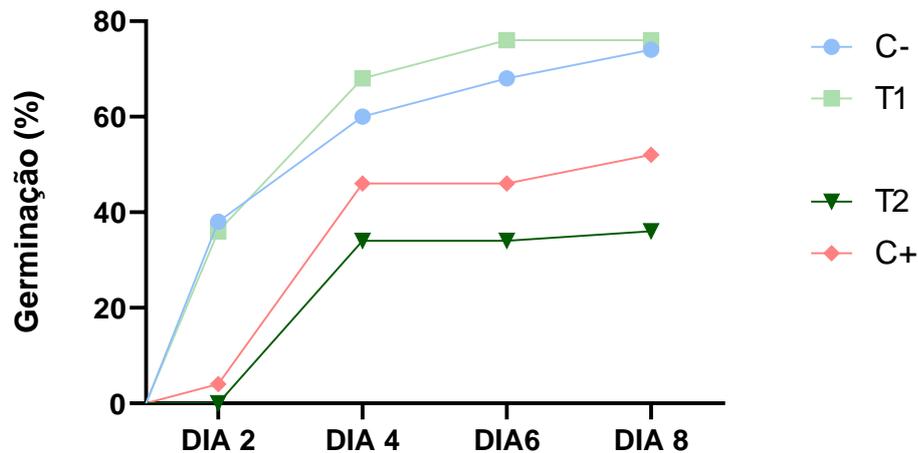


Gráfico 5. Taxa de germinação de sementes de milho ao longo de 8 dias de experimento. As sementes foram germinadas em caixa Gerbox contendo papel filtro embebido com os tratamentos: água destilada (C-), extrato diluído a 25% (T1), extrato a 100% (T2) e solução de cloreto de sódio 0,25 M (C+).

Com o intuito de analisar de forma mais detalhada os efeitos de extrato na germinação de milho, foram verificados alguns parâmetros morfológicos das sementes germinadas. Dentre eles, verificou-se que apesar da taxa de germinação entre C- e T1 serem similares, nos dados de comprimento da parte aérea houve diferença significativa entre ambos os tratamentos e o controle negativo (Gráfico 6B). Já em crescimento de raiz primária, há uma diferença significativa entre ambos os tratamentos e o controle negativo, onde os tratamentos se igualam estatisticamente ao controle positivo (Gráfico 6A), assim como nos dados de número de raízes secundárias (Gráfico 6C). O extrato, assim, causou uma drástica redução no comprimento da radícula, o que é um indicador ainda mais sensível dos efeitos fitotóxicos do extrato do que a própria germinação (PRATES et al., 2000).

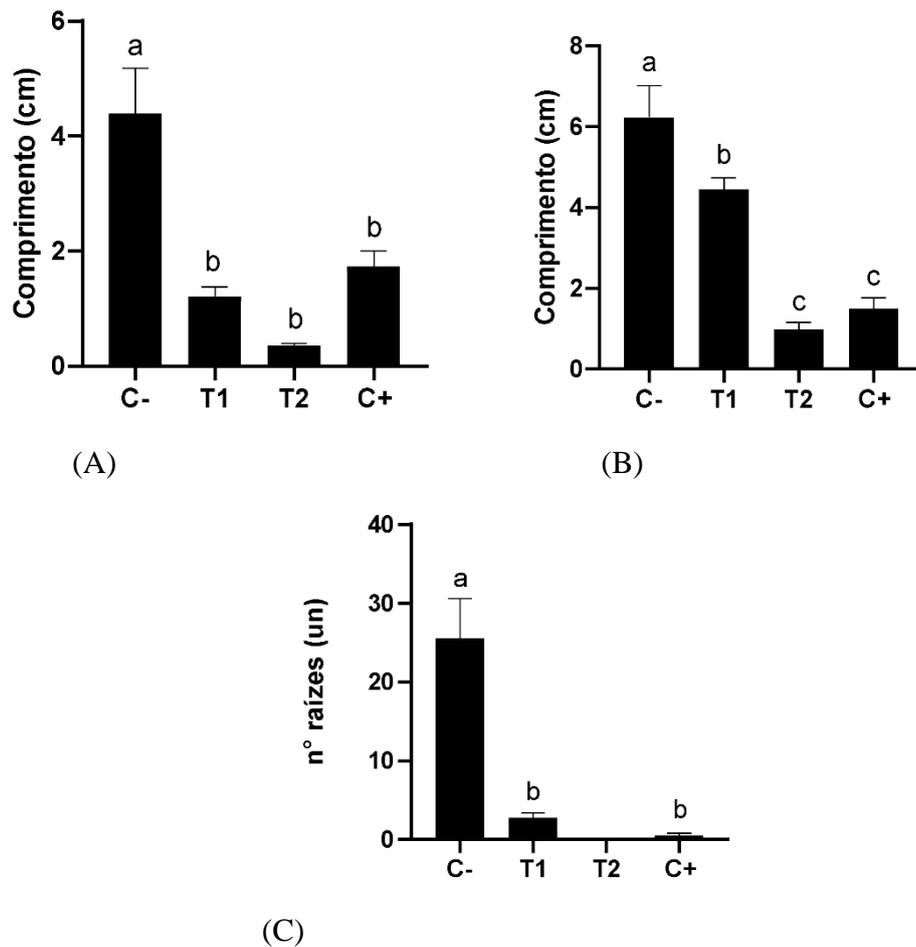


Gráfico 5. Parâmetros morfológicos relacionados à germinação de sementes de milho após 8 dias de experimento. As sementes foram germinadas em caixa gerbox contendo papel filtro embebido com os tratamentos: água destilada (C-), extrato diluído a 25% (T1), extrato a 100% (T2) e solução de cloreto de sódio 0,25 M (C+). A. crescimento da raiz primária; B. crescimento da parte aérea; e C. número de raízes secundárias por semente. Barras representam a média + erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa por teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

No experimento realizado com sementes de alface, apenas o controle negativo (C-, água destilada) germinou nos dois primeiros dias, sendo a taxa de germinação em ambos tratamentos com extrato igual a zero, e no controle positivo de apenas 2% (Tabela 1).

A velocidade de germinação também foi calculada e corrobora os dados anteriores de germinação (Tabela 2), demonstrando que os extratos de oliva afetam diretamente e de forma acentuada a taxa e a velocidade de germinação das sementes em ambas as espécies.

Tabela 1. Taxa de germinação de aquênios de alface ao longo de 8 dias de experimento. As sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro embebido com os tratamentos: água destilada (C-), extrato diluído a 25% (T1), extrato a 100% (T2) e solução de cloreto de sódio 0,25 M (C+).

	DIA 2	DIA 4	DIA 6	DIA 8
C-	96	98	98	98
T1	0	0	0	0
T2	0	0	0	0
C+	0	0	0	2

Tabela 2. Velocidade de germinação (W) de sementes de milho e alface ao longo de 8 dias de experimento. As sementes foram germinadas em papel filtro embebido com os tratamentos: água destilada (C-), extrato diluído a 25% (T1), extrato a 100% (T2) e solução de cloreto de sódio 0,25 M (C+).

	(W)	(W)
	Milho	Alface
C-	27,29	50,54
T1	28,58	0,00
T2	9,33	0,00
C+	13,83	0,13

O conjunto dos resultados correspondentes aos efeitos sobre o crescimento da planta e a sobre a germinação são interessantes do ponto de vista de aplicação, uma vez que a inibição de plantas ocorre em dois pontos distintos. A inibição de crescimento, mesmo após a planta ter germinado, pode ser considerado um mecanismo mais eficiente de seleção ecológica do que evitar a germinação da planta competidora. De acordo com Jacobi e Ferreira (1991), isto ocorreria porque dessa forma a descendência é eliminada, nos casos mais severos, por morte dos indivíduos, ou por um retardamento do crescimento ou de germinação. No caso do efeito sobre a germinação, se o desenvolvimento das outras espécies é prejudicado, a espécie favorecida pode estabelecer sua prole e evitar a pressão maior de competição (JACOBI & FERREIRA, 1991).

5.3. Avaliação de atividade antioxidante

5.3.1. Localização histoquímica *in situ* do acúmulo de peróxido de hidrogênio

As bordas marrons no controle negativo (Figura 4A) indicam a presença de peróxido de hidrogênio no tecido foliar. Sendo assim, foi verificada uma menor presença de oxidação no tratamento com extrato de oliveira (Figura 4C) do que no controle positivo (solução contendo rutina) (Figura 4B).

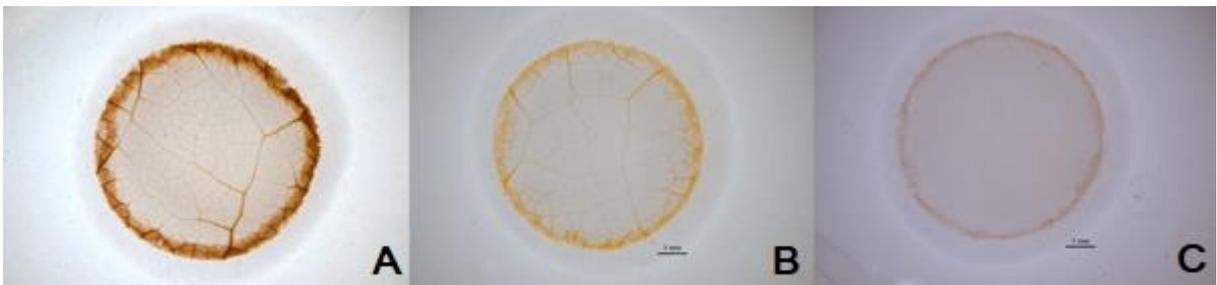


Figura 4. Localização histoquímica *in situ* do acúmulo de peróxido de hidrogênio. A. controle negativo (água destilada); B. controle positivo (rutina); e C. resíduo líquido da produção de azeite de oliva (100%).

5.3.2. Localização histoquímica *in situ* do acúmulo de superóxido

As bordas e pontos escuros (azuis) no controle negativo (Figura 5A) indicam o acúmulo de superóxido no tecido foliar. O controle positivo de solução contendo rutina (Figura 5B) também indicaram alguma presença de superóxido, o que não ocorreu no tratamento contendo o resíduo agrícola (Figura 5C).

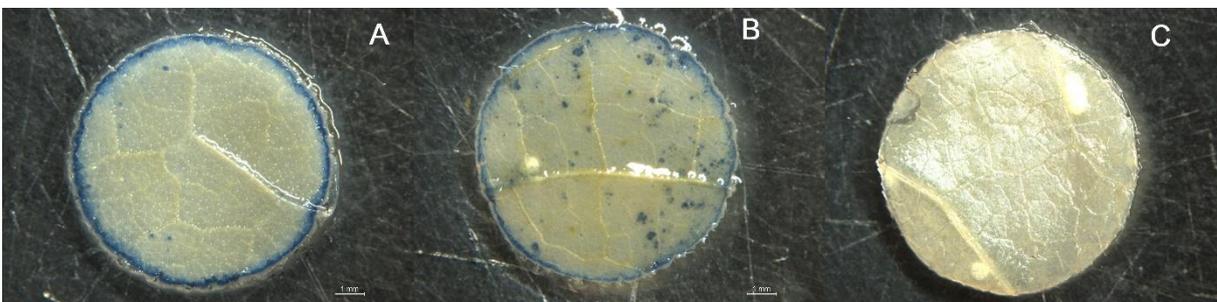


Figura 5. Localização histoquímica *in situ* do acúmulo de superóxido. A. controle negativo (água destilada); B. controle positivo (rutina); e C. resíduo líquido da produção de azeite de oliva (100%).

5.3.3. Teste *in vitro* de determinação de liberação de radical superóxido

Ambos os tratamentos mostraram-se efetivos em atividade antioxidante, visto que o controle positivo teve uma liberação de 25,22 % do radical superóxido, o tratamento menos concentrado (T2, relativo ao tratamento com diluição a 5%), 14,49 %, e o mais concentrado (T1, relativo ao extrato com diluição a 10%) apresentou apenas 12,58 % de liberação de liberação de radical superóxido em comparação ao controle negativo (100%).

Tabela 3. Percentual de liberação de radical superóxido com tratamento contendo água destilada (C-), extrato diluído a 5% (T1), extrato a 10% (T2) e solução de cloreto de sódio 0,25 M (C+).

% de Liberação de radical superóxido			
C-	T1	T2	C+
100,00	12,58	14,49	25,22

A capacidade antioxidante dos extratos das folhas de *Olea europaea* geralmente é atribuída a grandes concentrações de oleuropeína. Essa molécula também está presente nos frutos jovens da oliveira, entretanto, com a maturação ela se metaboliza em hidroxitirosol – que é um antioxidante mais potente - e sua concentração diminui (ERBAY & ICIER, 2010); estes autores salientam que a síntese laboratorial de hidroxitirosol é muito difícil e cara, logo, o uso do resíduo líquido dos frutos da oliveira (utilizados na produção de azeite de oliva) seria interessante pelo alto teor natural de hidroxitirosol e por ser um material que seria descartado. Além disso, os resultados de alta atividade oxidante do extrato do resíduo do fruto da *O. europaea* corroboram os resultados da literatura, incluindo o de Kuppasamy e colaboradores (2016), o qual, por método de triagem de extratos para o potencial antioxidante através de atividade de eliminação de radicais livres (inibição do DPPH), demonstrou que o resíduo das folhas de *O. europaea* está entre os oito mais efetivos, de um total de 25 resíduos analisados, em atividade antioxidante. Sendo assim, é possível inferir que o resíduo do fruto da oliveira teria potencial antioxidante similar ao extrato do resíduo de folhas. Nossos dados indicam que o resíduo líquido de oliveira gaúcha possui potente atividade antioxidante.

5.4. Análise fitoquímica preliminar

A análise qualitativa de algumas classes fitoquímicas demonstrou a provável presença no resíduo líquido da produção de azeite de oliva de: taninos condensados, flavononóis, flavanonas, flavonóis e/ou xantonas livres ou seus heterosídeos. Esse perfil de compostos fenólicos está de acordo com o potencial antioxidante deste produto e com o descrito na literatura como perfil fitoquímico tanto do fruto quanto das folhas desta espécie.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O extrato obtido do resíduo líquido da produção de azeite de oliva, apesar de não apresentar atividade deterrente na alimentação da espécie generalista *H. aspersa*, possui capacidade de reduzir o crescimento e germinação de diferentes espécies de plantas, demonstrado nesse trabalho com alface e milho. Tais características são relevantes quando consideradas questões de controle de plantas indesejadas (pré e pós emergência) em locais que serão destinados a cultivos para fins alimentícios (ou com plantas agrícolas em fase mais adiantada de desenvolvimento em relação a invasoras) e no consequente aumento da produção agrícola com a utilização de insumos considerados *eco-friendly*. Além disso, o extrato se mostrou muito efetivo quanto à capacidade antioxidante. Sendo assim, tais ingredientes bioativos podem ser promissores na indústria alimentícia como conservantes e nutracêuticos, na formulação de cosméticos, dentre outros. Assim, o estudo das características químicas e biológicas do resíduo da produção de azeite de oliva, bem como sua valorização como potencial produto devem ser incentivadas.

Entretanto, não foram determinados nesses estudos quais os compostos responsáveis pelas bioatividades, uma vez que o extrato utilizado não foi fracionado. Os resultados aqui expostos reforçam a relevância da exploração deste resíduo como fonte de compostos bioativos para diversos setores. Assim, estudos posteriores são necessários para buscar determinar o composto ou grupo de compostos responsáveis por tais características. Ademais, visto que os impactos causados pelos extratos diferem para cada espécie, e que as aqui utilizadas foram limitadas, há a necessidade de avaliar os possíveis efeitos biológicos em uma quantidade mais abrangente de espécies, como leguminosas e plantas invasoras de interesse agrônomo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAZA, L., TAAMALLI, A., NSIR, H., ZARROUK, M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*, v. 4, n. 4, p. 682-698, 2015.
- APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 55, p. 373-399, 2004.
- AZEVEDO NETO, A.D.; TABOSA, J.N. Estresse salino em plântulas de milho: parte I análise do crescimento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.4, n.2, p.159-164, 2000.
- BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. El cultivo del olivo. 7. ed. Madri: Mundi-Prensa-Junta de Andalucía, 2007.
- BRAKE, M., MIGDADI, H., AL-GHARAIBEH, M., AYOUB, S., HADDAD, N., & EL OQLAH, A. Characterization of Jordanian olive cultivars (*Olea europaea* L.) using RAPD and ISSR molecular markers. *Scientia Horticulturae*, v. 176, p. 282-289, 2014.
- COUTINHO, E.F.; WREGE, M.S.; REISSER JÚNIOR, C.; ALMEIDA, I.R. de; STEINMETZ, S. Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.): clima. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009 (Sistema de produção).
- DE ALMEIDA, F. S. Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 2, p. 221-236, 1991.
- ERBAY, Z., ICIER, F. The importance and potential uses of olive leaves. *Food Reviews International*, v. 26, n. 4, p. 319-334, 2010.
- HAMOUDA, A. B., BOUSSADIA, O., KHAOULA, B., LAARIF, A., BRAHAM, M. Studies on insecticidal and deterrent effects of olive leaf extracts on *Myzus persicae* and *Phthorimaea operculella*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 3, n. 6, p. 294-297, 2015.
- GARCÍA MOLANO, J. F. La Biodiversidad del olivo (*Olea europaea* L.) en Colombia: estudio molecular, morfológico y fenológico del germoplasma local. Diss. Università degli Studi di Parma. Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, 2012.

HERNÁNDEZ, Guillermo Rico. Fauna exótica e invasora en Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2010.

JACOBI, U. S. & FERREIRA, A. G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC.) sobre espécies cultivadas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 26, p. 935-943, 1991.

JANSEN, M. K., GABA, V., GREENBERG, B. M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Trends in plant science, v. 3, n. 4, p. 131-135, 1998.

JESUS, A. M. G. Olivicultura de precisão: Avaliação da variabilidade espacial da produtividade e qualidade da azeitona e azeite num olival semi-intensivo. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronômica) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2013.

KUPPUSAMY, S., THAVAMANI, P., MEGHARAJ, M., NIROLA, R., LEE, Y. B., & NAIDU, R. Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. Industrial Crops and Products, 83, 630-634, 2016.

MAGIERO, E. C., ASSMANN, J. M., MARCHESE, J. A., CAPELIN, D., PALADINI, M. V., & TREZZI, M. M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1. Crop science, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MATSUURA, H. N. Papel do alcalóide N,β-D-glicopiranosil vincosamida na resposta a dano mecânico e herbivoria em *Psychotria leiocarpa* Cham & Schltldl. 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MATSUURA, H. N., FRAGOSO, V., PARANHOS, J. T., RAU, M. R., FETT-NETO, A. G. The bioactive monoterpene índole alkaloid N,β-D glucopyranosyl vincosamide is regulated by irradiance quality and development in *Psychotria leiocarpa*. Industrial Crops and Products v.86, n. 2010-2018, 2016.

MATOS, F. J. A.; Introdução à Fitoquímica Experimental; Ed. da UFC, Fortaleza, Ceará 1988.

MÁXIMO, T. C. B. Práticas agrícolas associadas à olivicultura em modo de produção biológico e efeito na qualidade da azeitona e azeite na região de Trás-os-Montes. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança. 2013.

NAJAFIAN, L., GHODSVALI, A., KHODAPARAST, M. H., DIOSADY, L. L. Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International* v. 42, p.171-175, 2009.

PRATES, H. T., PAES, J. M. V., PIRES, N. M., PEREIRA, I. A., MAGALHÃES, P. C. Efeito do Extrato Aquoso de Leucena na Germinação e no Desenvolvimento do Milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.1, p. 909-914, 2001.

RODEGHIERO, J. M. Caracterização Físico-Química e Atividade Antioxidante de Azeites de Oliva Produzidos no Rio Grande do SUL. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

SERRALVES, Consulta de flora no site do Parque de Serralves. Disponível em: <http://sig.serralves.pt/pt/flora/detalhe.php?id=951> Acesso em: 14 de agosto de 2018.

SMITH, D. B., RODDICK, J. G., JONES, J. L. Synergism between the potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine in inhibition of snail feeding. *Phytochemistry*, v. 57, n. 2, p. 229-234, 2001.

SHALHEVET, J.; HUCK, M.G.; SCHROEDER, B.P. Root and shoot growth responses to salinity in maize and soybean. *Agronomy Journal*, v.87, n.3, p.512-516, 1995.

SHI, J., FU, X. Z., PENG, T., HUANG, X. S., FAN, Q. J., & LIU, J. H. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus *in vitro* plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiology*, v. 30, n. 7, p. 914-922, 2010.

TASIOULA-MARGARI, M., TSABOLATIDOU, E. Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*, v. 4, n. 3, p. 548-562, 2015.

WANI, T. A., MASOODI, F. A., GANI, A., BABA, W. N., RAHMANIAN, N., WANI, I. A., AHMAD, M. Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol—A review of the recent literature. *Trends in Food Science & Technology*, v. 77, p. 77-90, 2018.

WINKELHAUSEN, E., POSPIECH, R., LAUFENBERG, G. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, v. 24, n. 1, p. 41-46, 2005.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.