

COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS E QUANTIFICAÇÃO DE TOCOFEROL E FITOESTEROL EM AZEITONAS DA VARIEDADE ARBEQUINA

Michele Cristina Silva¹, Jessica dos Santos Pizzo², Patrícia D. S. Santos³, Oscar Oliveira Santos⁴, Jesui Vergilio Visentainer⁵

¹Acadêmica de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista Capes-UEM, michelecsilvaa@hotmail.com

²Acadêmica de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista Capes-UEM, jehspizzo@hotmail.com

³Acadêmica de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista Capes-UEM, patriciadanieless@hotmail.com

⁴Professor do programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM. oliveirasantos.oscardeoliveira@gmail.com

⁵Professor do programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM. jesuiv@gmail.com

RESUMO

O óleo e o fruto da azeitona possuem composição química benéfica para a saúde humana, devido a presença de ácidos graxos, principalmente ácidos graxos monoinsaturados, e a de componentes menores como tocoferóis, compostos fenólicos, fitoesteróis e vitaminas. Sendo assim, neste trabalho, determinou-se a composição em ácidos graxos, e a identificação e a quantificação de tocoferóis e fitoesteróis em amostras de azeitona da variedade arbequina, através da cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector por ionização em chama (GC-DIC). A partir dos resultados, pode verificar-se que entre todos os ácidos graxos, o ácido oleico (18:1n-9; 640,51 mg g⁻¹) foi o que se apresentou em maior quantidade no óleo extraído, seguido pelo ácido palmítico (16:0; 133,36 mg g⁻¹) e pelo ácido linoleico (18:2n-6; 65,44 mg g⁻¹). Quanto a composição de fitoesteróis e tocoferóis, verificou-se a presença do α -tocoferol, γ -tocoferol, campesterol, β -sitosterol e stigmasterol na amostra de óleo de azeitona, enquanto que na amostra de azeitona (polpa + semente), apenas os fitoesteróis (campesterol, β -sitosterol e stigmasterol) foram detectados. Portanto, pode-se observar que o óleo de oliva possui compostos de grande qualidade em sua composição que auxiliam na saúde das pessoas que o consome.

PALAVRAS-CHAVE: Cromatografia; Azeite de Oliva; Ácido Oleico.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore de tamanho médio, originária da bacia do Mediterrâneo, que produz frutos comestíveis chamados de azeitonas (CASTRO et al., 1997). Existem mais de 30 variedades diferentes de oliveira, sendo que todas apresentam grande importância por produzir azeitonas que constituem a matéria-prima para extração de azeite e/ou produção de azeitonas em conserva (PESTANA-BAUER et al., 2011). Dentre essas variedades, as que melhor se adaptaram ao solo e clima brasileiro foram as koroneike, arbosana, arbequina, manzanilla (COUTINHO et al., 2009).

A arbequina, objeto deste estudo, foi cultivada pela primeira vez no município de Arbeca (Lleida, Catalunha, Espanha). Ela possui a característica de ser resistente a climas frios. Seus frutos são pequenos, porém possui rendimento de óleo relativamente alto (20,5 %) (BAKHOUCHE et al., 2013).

Tanto o óleo quanto a polpa da azeitona possuem uma composição química altamente valorizada, devido a presença de compostos que contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, circulatórias, neurológicas e cancerígenas. Estes benefícios estão associados à presença de ácidos graxos, principalmente ácidos graxos monoinsaturados, e a componentes menores como tocoferóis, compostos fenólicos, fitoesteróis e vitaminas (ZEB e MURKOVIC, 2011).

A grande quantidade do ácido oleico (18:1n-9), um ácido graxo monoinsaturado, que varia de 56 a 84 % do total de ácidos graxos na composição do óleo extraído da azeitona, é uma característica que a diferencia de outros óleos vegetais. Além disso, o

azeite virgem da azeitona é rico em antioxidantes naturais, como os carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos (MORELLO et al., 2004).

Os Tocoferóis pertencem ao grupo da vitamina E, e encontram-se na forma de quatro homólogos diferentes α , β , γ e δ tocoferol (PERZUATTI et al., 2015). As diferenças entre tocoferóis homólogos deve-se à metilação do anel cromanol, sendo que o α é trimetilado (posições 5, 7 e 8), o β (posições 5 e 8) e o γ (posições 7 e 8) são bimetilados, e o δ é monometilado (posição 8) (SHEPPARD ET AL., 1992; FENNEMA, 2010).

Muitos estudos mostraram que o consumo de tocoferóis auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares e também na prevenção de vários tipos de câncer (Van Eenennaam, 2003; Lincoln et al., 2007; Durrett et al., 2003), além de, reduzir a incidência de doenças graves, como Retinopatia da Prematuridade, hemorragia, displasia bronco pulmonar e anemia hemolítica (PHELPS et al., 1987). Esses benefícios estão associados à capacidade antioxidante da vitamina E que inibem o ataque de radicais livres, interrompendo a cadeia de reações radicalares (HOUNSOME et al., 2008).

Com relação aos fitoesteróis, essa classe é composta por mais de 200 compostos diferentes que se originam em uma variedade de vegetação e flora aquática (MOREAU et al., 2002), todos são compostos tetracíclicos com 27, 28 ou 29 átomos de carbono, no entanto, diferenciam-se geralmente por modificações relacionadas à adição de substituintes, como metil, etil ou insaturações nas posições C-24 (carbono 24) ou C-22 (SHAHZAD, 2017).

O consumo de fitoesteróis está relacionado à proteção contra várias doenças crônicas, como doenças cardiovasculares (JONES e ABUMWEIS, 2009; CALPE-BERDIEL, ESCOLÀ-GIL e BLANCO-VACA, 2009), hepatoprotetora (PLAT et al., 2014), diabetes (MISAWA et al. 2012) e câncer (JONES E ABUMWEIS, 2009) e principalmente com o efeito hipocolesterolêmico. Esses compostos bioativos são encontrados principalmente em vegetais, grãos em geral e principalmente óleos vegetais (ROS, 2010), sendo que os fitoesteróis mais abundantes são: campesterol, estigmasterol e sitosterol (OSTLUND, 2002).

Tocoferóis e fitoesteróis podem estar unidos à membranas, lipoproteínas e partículas de gordura, além de estarem presentes nas matrizes alimentares, juntamente com outros interferentes, como proteínas e carboidratos. Assim, a preparação da amostra para a análise de ambos geralmente inclui o passo de extração de lipídios, sempre precedido por hidrólise alcalina conhecida como saponificação. Após a saponificação, é realizada a extração dos componentes insaponificáveis, como os tocoferóis e fitoesteróis, utilizando solventes orgânicos (ABIDI, 200; SOUZA ET AL., 2014).

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi realizar a determinação da composição em ácidos graxos, e a identificação e quantificação de tocoferol e fitoesterol em amostras de azeitona da variedade arbequina, através da cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector por ionização em chama (GC-DIC).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Para a realização das análises, foi utilizada a oliva da variedade arbequina. A amostra foi colhida em Coxilha dos Cunhas, Canguçu, no estado do Rio Grande do Sul. Os frutos frescos foram limpos em água corrente, triturados, embalados a vácuo e mantidos a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores. Todas as análises químicas foram realizadas em triplicata.

2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DA AZEITONA

Para a extração dos lipídios totais (LT) foi utilizado o método descrito por Bligh e Dyer (1959), o qual consiste em uma extração líquido-sólido, que utiliza clorofórmio, metanol e água numa proporção de 2:2:1,8 (v/v/v). Foram pesados 15 g de amostra em um béquer de 250 mL. Em seguida foram adicionados 15 mL de clorofórmio e 30 mL de metanol. A mistura foi deixada sob agitação, em um agitador magnético, durante 5 min. Após esse tempo, adicionou-se mais 15 mL de clorofórmio, permanecendo sob agitação por mais 2 min. Após, foram adicionados mais 15 mL de água destilada, sendo que a mistura permaneceu sob agitação por mais 5 min. Após esse processo, a mistura foi filtrada à vácuo em um funil de Büchner e o líquido foi transferido para um funil de separação, onde permaneceu até a separação completa de duas fases, a fase aquosa e a fase orgânica. Do funil de separação, foi coletada a fase inferior (orgânica) contendo a fase lipídica com o clorofórmio, e em seguida esta fase foi rota-evaporada, permanecendo apenas os LT presentes na azeitona.

2.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS POR CG-DIC

Para a determinação da composição em ácidos graxos, eles foram derivatizados a ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) utilizando o método proposto por Hartman e Lago (1973) e modificado por Maia e Rodriguez-Amaya (1993).

Os EMAGs foram identificados a partir da comparação de seus tempos de retenção com padrões analíticos relativos (FAME Mix, C4-C24, SIGMA, USA). A quantificação absoluta dos EMAGs foi realizada através da padronização interna, utilizando como padrão o éster metílico do ácido tricosanoico (23:0, SIGMA, USA), e os cálculos foram realizados conforme o método proposto por Joseph & Ackman (1992).

Fatores de correção teóricos (VISENTAINER, 2012) foram empregados para a determinação dos valores de concentrações. A quantidade de ácidos graxos nas amostras foi calculada em mg g⁻¹ de lipídios totais (mg g⁻¹ de LT) utilizando a Equação 1.

$$M_x = \frac{A_x M_p F_{CT}}{A_p M_A F_{CEA}} \quad (1)$$

na qual,

M_x : massa do ácido graxo x em mg g⁻¹ de lipídios totais;

M_p : massa do padrão interno em mg;

M_a : massa da amostra;

A_p : área do padrão interno;

A_x : área do ácido graxo x;

F_{CT} : fator de correção (do detector de ionização chama) teórico do ácido graxo;

F_{CEA} : fator de conversão de metil éster para ácido graxo.

2.4 SAPONIFICAÇÃO

A saponificação foi realizada de acordo com Costa et al. O processo de saponificação foi realizado tanto no óleo da azeitona extraído pelo método Bligh Dyer, quanto na mistura de polpa e semente moídas e homogeneizadas. Inicialmente, foram pesados 0,1 g amostra, logo após, foi adicionado 1 mL de solução etanólica de KOH (1 mol L⁻¹). A solução foi colocada em banho de água a 70 ° C por 50 min. Após o resfriamento, foram adicionados 1 mL de água destilada e a fração insaponificável foi extraída usando particionamento líquido-líquido em água destilada e 5 mL de n-heptano. A fase orgânica foi transferida para um tubo contendo Na₂SO₄, e a extração foi repetida duas vezes com 5 e 4 mL de n-heptano, respectivamente. Todos esses três extratos foram combinados e homogeneizados antes da injeção em o sistema GC.

2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE TOCOFERÓIS E FITOESTERÓIS POR CG-DIC

A determinação de tocoferóis e fitoesteróis por cromatografia em fase gasosa foi realizada em um cromatógrafo a gás Trace Ultra Triplus (Thermo Scientific) equipado com um detector de ionização em chama (DIC). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna capilar de fase estacionária não polar polimérica OPTIMA[®] 5MS (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de 5% de difenilo e 95% de dimetilpolisiloxano) da Macherey-Nagel.

Os parâmetros de operação utilizados foram: temperatura do injetor 110 °C e temperatura do detector 340 °C. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL. A temperatura do forno do CG-DIC foi iniciada em 220 °C, mantida nesta temperatura durante 2 min e depois foi aquecida a 320 °C por 20 °C min⁻¹. O tempo de injeção total foi de 11 min. As taxas de fluxo de gás utilizadas foram 1,2 mL min⁻¹ de gás de arraste (H₂), 30 mL min⁻¹ gás de *makeup* (N₂), e 35 e 350 mL min⁻¹ de gases de chama (H₂ e ar sintético, respectivamente).

2.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS TOCOFERÓIS E FITOESTERÓIS

Foram utilizados padrões de α-tocoferol, γ-tocoferol, campesterol, β-sitosterol e stigmasterol, para a identificação dos compostos na amostra, através da comparação do tempo de retenção. As análises quantitativas foram realizadas por meio de adição padrão, um método no qual são adicionadas quantidades conhecidas do analito na amostra (*spiking*), mantendo a matriz inalterada, exceto pela concentração do analito (SKOOG, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS POR CG-DIC

A composição em ácidos graxos do óleo de azeitona da variedade arbequina está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição em ácidos graxos (mg g⁻¹ de lipídios totais) do óleo de azeitona

Ácido graxo	mg g ⁻¹ de lipídios totais
16:0	133,36 ± 9,26
16:1n-7	11,40 ± 0,97

18:0	15,00 ± 1,40
18:1n-9	640,51 ± 4,06
18:1n-7	36,83 ± 0,19
18:2n-6	65,44 ± 5,28
18:3n-3	8,17 ± 0,56
20:0	3,34 ± 0,30
20:1n-9	2,95 ± 0,22
24:0	3,68 ± 0,33

Fonte: Dados da pesquisa (2019). Resultados expressos como média ± DP (desvio padrão) de três replicatas.

A partir da análise da composição em ácidos graxos, foram identificados e quantificados dez ácidos graxos no óleo de azeitona.

Dentre todos os ácidos graxos, o ácido oleico (18:1n-9; 640,51 mg g⁻¹) foi o que se apresentou em maior quantidade no óleo extraído, representando 70 % da porcentagem total de ácido graxo. Esse resultado é similar ao encontrado por Silva et al. (2012).

Entre os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (16:0; 133,36 mg g⁻¹) apresentou-se como majoritário, enquanto que o maior contribuinte na classe de ácidos graxos poli-insaturados foi o ácido linoleico (18:2n-6; 65,44 mg g⁻¹).

O ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado, apresenta ação benéfica à saúde. Estudos realizados por Menezes et al. (2005) comprovaram a sua eficácia no tratamento de câncer de mama. Pesquisas realizadas por Kris-Etherton et al. (1999) e Larsen et al. (1999) enfatizaram o papel do azeite de oliva na proteção cardiovascular, sendo muitos dos efeitos saudáveis atribuídos ao alto conteúdo de ácido oleico presente no azeite.

3.2 CONCENTRAÇÃO DE TOCOFERÓIS E FITOESTERÓIS NA AMOSTRA DA ARBEQUINA

A determinação dos fitoesteróis nas amostras de óleo e polpa + semente de azeitona foram realizadas utilizando a técnica de saponificação, seguida pela análise por GC-FID.

A Tabela 2, apresenta os tocoferóis e fitoesteróis encontrados na azeitona (semente + polpa) e no óleo de azeitona. As quantidades dos compostos foram calculadas por estimativa, ou seja, comparando a área dos picos dos padrões cuja a concentração é conhecida (1 ppm), com a área dos picos do tocoferol ou fitoesterol referente ao padrão.

Tabela 2: Conteúdos de tocoferóis e fitoesteróis na azeitona (mg.g⁻¹ de amostra) e no óleo de azeitona (mg.100mg⁻¹ de óleo)

	Azeitona (mg.g ⁻¹ de amostra)	Óleo de Azeitona (mg 100mg ⁻¹ de óleo)
α-tocoferol	ND	2,14
γ -tocoferol	ND	2,07
Campesterol	5,01	6,56

β-sitosterol	184,75	184,48
Stigmasterol	6,04	7,40

Fonte: Dados da pesquisa (2019). Resultados expressos como média de três replicatas. ND: Não detectado.

Nas amostras de óleo de azeitona cinco compostos foram detectados, dois tocoferóis e três fitoesteróis, no entanto, quando as análises foram feitas na amostra de azeitona (polpa + semente), apenas os fitoesteróis foram detectados.

As baixas concentrações de tocoferóis encontradas no óleo de azeitona podem ser explicadas pelo método de separação aplicado, uma vez que, a separação por cromatografia gasosa dificilmente é utilizada para separação desses compostos, enquanto que a cromatografia líquida (CL) é o método mais comumente usado para analisar os principais tocoferóis em óleos (AOCS, 1989). Enquanto que para os fitoesteróis, geralmente, as análises em óleos comestíveis são realizadas por GC (Kalo & Kuuranne, 2001, Xu et al., 2018).

O β -sitosterol foi o composto presente em maior quantidade tanto na azeitona quanto no óleo de azeitona. O campesterol, o stigmasterol e o β -sitosterol estão estruturalmente relacionados ao colesterol. Sabe-se que os β -sitosteróis reduzem a absorção de colesterol e, portanto, a sua alta quantidade encontrada é uma vantagem adicional e um benefício ao consumo deste tipo de alimento (GORINSTEIN et al., 2003).

4 CONCLUSÃO

A composição em ácidos graxos da azeitona da variedade arbequina foi realizada de forma eficiente, e corroborou a alta concentração do ácido graxo 18:1n-9 (ômega-9) encontrado pra essas amostras na literatura. Além disso, foram encontrados compostos antioxidantes (tocoferóis e fitoesteróis) de alto valor nutricional, tanto no óleo, quanto na mistura de polpa e semente da azeitona. Nas amostras de óleo de azeitona cinco compostos foram detectados, dois tocoferóis e três fitoesteróis, enquanto que nas amostras de polpa + semente apenas os fitoesteróis foram detectados. Dentre todos os compostos, o encontrado em maior teor foi o β -sitosterol, este está relacionado com a redução da absorção do colesterol.

REFERÊNCIAS

ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 197-216, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730000131X>. Acesso em: 30 jul. 2019.

AOCS, 1989. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC D. Firestone (Ed.), Official method (Ce 8-89), AOCS Press, Champaign, IL, p. 8-89. Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85046719165&origin=inward>. Acesso em: 04 ago. 2019.

BAKHOUCHE, A.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; JOVEN, J.; SEGURA-

CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. **Food Research International**, v. 50, p. 401–408, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912004644>. Acesso em: 30 jul. 2019.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/o59-099>. Acesso em: 30 jul. 2019.

CASTRO, C.; GUERREIRO, M.; CALDEIRA, F.; PINTO, P. Aspectos generales del sector oleícola em Portugal. **Fruticultura Profesional**, v. 88, p. 28-35, 1997. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2654909> .Acesso em: 30 jul. 2019.

CALPE-BERDIEL, L.; ESCOLÀ-GIL, J.C. & BLANCO-VACA, F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism, **Atherosclerosis**, v.203, p.18–31, 2009. Disponível em: [https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(08\)00449-8/abstract](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(08)00449-8/abstract). Acesso em: 05 ago. 2019.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**., v.43, p.1603, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910001298>. Acesso em: 4 ago. 2019.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). **Embrapa**, ISSN 1806-9207, 2009. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/783494/cultivo-de-oliveira-olea-europaea-l> . Acesso em: 30 jul. 2019.

VAN EENENNAAM, A.; LINCOLN, K.; DURRETT, T.; VALENTIN, H.; SHEWMAKER, C.; THORNE, G.; JIANG, J.; BASZIS, S.; LEVERING, C.; AASEN, E.; HAO, M.; STEIN, J.; NORRIS, S. & LAST R. Engineering Vitamin E Content: From Arabidopsis Mutant to Soy Oil. *The Plant Cell*, 29, 2003. Disponível em: <http://www.plantcell.org/content/15/12/3007>. Acesso em: 05 ago. 2019.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. ESTADO: Editora Artmed, 2010.

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O.; KATRICH, E.; LOJEK, A.; ČÍŽ, M.; GLIGELMO-MIGUEL, N. et al. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 154–159, 2003. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286302002784>. Acesso em: 30 jul. 2019.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, v. 22, n. 6, p. 475–6, 1973. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/18441624_Rapid_preparation_of_fatty_acid_methyl_esters. Acesso em: 01 jul. 2019

HOUNSOME, N.; HOUNSOME, B.; TOMOS, D. & EDWARD-JONES, G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 48– 65, 2008. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Plant-metabolites-and-nutritional-quality-of-Hounsome-Hounsome/11daf7b41bc686fccb9a03e874fc97a7a7d2477c>. Acesso em: 06 ago. 2019.

JONES, P. J.; ABUMWEIS, S. S. Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 12, p. 147–151, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19209468> . Acesso em: 30 jul. 2019.

JOSEPH, J. D., & ACKMAN, R. G. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.75, p.488–506. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=e84b1c9c-3246-4e4e-9e70-7cffde531c96>. Acesso em: 7 ago. 2019.

KALO, P.; KUURANNE, T. Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry **Journal of Chromatography A**, v. 935, p.237-248, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301013152>. Acesso em: 04 de agosto de 2019.

MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação de um método simples e econômico para metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, p. 27–35, 1993. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nexAction=Ink&exprSearch=141017&indexSearch=ID>. Acesso em: 7 ago. 2019.

MISAWA, E.; TANAKA, M.; NOMAGUCHI, K.; NABESHIMA, K.; YAMADA, M.; TOIDA, T.; IWATSUKI, K. Oral ingestion of aloe vera phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in Zucker diabetic fatty rats, **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 60, p. 2799–2806, 2012. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Oral-ingestion-of-aloe-vera-phytosterols-alters-and-Misawa-Tanaka/bd609f4d803477d2c1a20923c7f9ae13077c21ff> . Acesso em: 30 jul. 2019.

MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and healthpromoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 457–500, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782702000061> . Acesso em: 30 jul. 2019.

OSTLUND, R. E. Phytosterols in human nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v.15, p.533-549, 2002. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.nutr.22.020702.075220>. Acesso em: 04 ago. 2019.

PERZUATTI, P. B.; SGANZERLA, M.; JACQUES, A. C.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R. C. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. **LWT - Food Science and Technology**,

v. 64, p. 259-263, 2015. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815003801> . Acesso em: 30 jul. 2019.

PESTANA-BAUER, V. R.; GOULARTE-DUTRA, F. L.; ZAMBIAZI R. C. Caracterização do fruto da Oliveira (variedade carolea) cultivada na região sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, p. 79-87, 2011. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1352/1071>. Acesso em: 30 jul. 2019.

PHELPS, D. L.; ROSENBAUM, A. L.; ISENBERG, S. J.; LEAKE, R. D.; DOREY, F. J. Tocopherol efficacy and safety for preventing retinopathy of prematurity: a randomized, controlled, double-masked trial. **Pediatrics**, v. 79, p. 489–500, 1987. Disponível em: <https://pediatrics.aappublications.org/content/79/4/489.abstract>. Acesso em: 30 jul. 2019.

PLAT, J.; HENDRIKX, T.; BIEGHS, V.; JEURISSEN, M. L.; WALENBERGH, S. M.; VAN GORP, J.; DE SMET, E.; KONINGS, M.; VREUGDENHIL, A. C.; GUICHOT, Y. D.; RENSEN, S. S.; BUURMAN, W. A.; GREVE, J. W.; LÜTJOHANN, D.; MENSINK, R. P. & SHIRI-SVERDLOV, R. Protective role of plant sterol and stanol esters in liver inflammation: insights from mice and humans. **Plos One**, v.9,p.110-128, 2014. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Protective-Role-of-Plant-Sterol-and-Stanol-Esters-Plat-Hendrikx/3475c215dc52a343f1122c5991575fa3a16644f1>. Acesso em: 4 ago. 2014.

SHAHZAD, N.; KHAN, W.; SHADAB M. D., ALI, A.; SALUJA, S. S.; SHARMA, S.; FAISAL A.; ABDULJALEEL, Z.; IBRAHIM, I. A. A.; ABDEL-WAHAB, A. F.; AFIFY, M. A. & AL-GHAMDI, S. S. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.88, p.786–794, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216324052>. Acesso em: 06 ago. 2019.

SHEPPARD, A. J.; PENNINGTON, J. A. T. Analysis and distribution of vitamin E in vegetables oils and foods. *Journal of Vitamin E in health and disease*. **New York: Marcel Dekker**, v. 1, p. 9-31, 1992.

SKOOG, A. D.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SLAVIN, M.; YU, L. L. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2789–2795, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612010163> . Acesso em: 30 jul. 2019.

SOUZA, A. H. P.; GOHARA, A. K.; RODRIGUES, A. C.; LUIZA, G. Optimization conditions of samples saponification for tocopherol Analysis. **Food Chemistry**, v. 158, p. 315– 318, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614001745>. Acesso em: 30 jul. 2019.

KRIS-ETHERTON, P. M.; PEARSON, T. A.; WAN, Y.; HARGROVE, R.L.; MORIATRITY, K.; FISHELL, V.; ETHERTON, T. D. High-monounsaturated fatty acid diets lower both

plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 1009-1015, 1999. Disponível em: <https://peanut-institute.com/research-library/high-monounsaturated-fatty-acid-diets-lower-both-plasma-cholesterol-and-triacylglycerol-concentrations/> . Acesso em: 30 jul. 2019.

LARSEN, L. F.; JESPERSEN, J.; MARCKMANN, P. Are olive oil diets antithrombotic? Diets enriched with olive, rapeseed, or sunflower oil affect postprandial factor VII differently. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 976-982, 1999. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/70/6/976/4729095>. Acesso em: 30 jul. 2019.

MENEZES, J. A.; VELLON, L.; COLOMER, R., LUPU, R. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. **Annals of Oncology**, v. 3, p. 359-371, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/annonc/article/16/3/359/160032>. Acesso em: 30 jul. 2019.

MORELLO, J. R. et al. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. **Food Chemistry**, v. 85, p. 357–364, 2004. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603003625>. Acesso em 30 jul. 2019.

ROS, E. Health benefits of nut consumption. **Nutrients**, v.2, p.652–682, 2010. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/2/7/652/htm>. Acesso em: 06 ago. 2019.

SILVA, O. L. F.; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R., ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, v. 71, p. 2, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052012000200008&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 30 jul. 2019.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v.35, p.274-279, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000200008. Acesso em: 01 ago. 2019.

Xu, B.C.; Zhang, L. X.; Ma, F.; Zhang, W.; Wang, X. P.; Zhang, Q.; Li, P. W.; Determination of free steroidal compounds in vegetable oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry **Food Chemistry**, v. 245, p. 415-425, 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617317521>. Acesso em: 02 de agosto de 2019.

ZEB, A.; MURKOVIC, M. Olive (*Olea europaea* L.) Seeds, From Chemistry to Health Benefits. **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**, p. 847–853, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123756886101008>. Acesso em: 30 jul. 2019.