



**ABIGAIL ALFAIATE
SIMÕES**

**CARACTERIZAÇÃO DO LIPIDOMA E AVALIAÇÃO
DA BIOATIVIDADE DE SEMENTES DE AZEITONA
PARA VALORIZAÇÃO COMO SUBPRODUTO
AGROINDUSTRIAL**



**ABIGAIL ALFAIATE
SIMÕES**

**CARACTERIZAÇÃO DO LIPIDOMA E AVALIAÇÃO DA
BIOATIVIDADE DE SEMENTES DE AZEITONA PARA
VALORIZAÇÃO COMO SUBPRODUTO
AGROINDUSTRIAL**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimentos dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Eliana Sousa Cruz Ferreira Alves, Investigadora Júnior do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

A Universidade de Aveiro e a FCT/MCT apoiaram financeiramente a Unidade de investigação QOPNA (FCT UID/QUI/00062/2019) através de fundos nacionais e, onde aplicável, co-financiamento pelo FEDER, no âmbito do Acordo da Parceria Portugal2020 e à Rede Portuguesa de RMN

A ti, minha afilhada Beatriz.

o júri

presidente

Professor Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Professora Doutora Luísa Alejandra Helguero
Professora auxiliar do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro

orientadora

Doutora Eliana Sousa Cruz Ferreira Alves
Investigadora júnior do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Doutora Eliana Alves, orientadora, agradeço pela forma como acompanhou o desenvolvimento da tese. Pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade, confiança, atenção, motivação, apoio e ajuda que me proporcionou ao longo deste trabalho. Os meus sinceros agradecimentos!

À Professora Doutora Maria do Rosário Domingues, co-orientadora, agradeço pelo seu ânimo, motivação, conselhos prestados, ajuda e atenção ao longo deste trabalho. Muito obrigada!

À Doutora Ana Peixoto Gomes e à Doutora Carla Pereira do Departamento de Biologia, agradeço pela disponibilidade e ajuda neste trabalho.

Aos colegas do grupo de lipidómica e a todo o pessoal de laboratório, agradeço, pela receção, boa disposição, disponibilidade e entreaajuda durante este trabalho.

À minha família e aos meus amigos que fazem parte da minha vida, que estiveram mais próximos durante esta viagem, agradeço, por todo o vosso apoio, hoje e SEMPRE.

Aos meus pais pelo apoio e por me ajudarem a alcançar os meus objetivos. Muito obrigada!

Ao Bruno de Lima Pinto, agradeço por toda a amizade, atenção, motivação, apoio e ajuda ao longo destes anos. O tempo mostra quem deve permanecer na minha vida, e tu sem dúvida que és uma dessas pessoas! Muito obrigada!

À minha afilhada Beatriz um grande beijinho e a quem dedico este trabalho.

À minha madrinha Elisabete Alfaiate, agradeço pela atenção e motivação.

E por último, ao Orfeão *Vox Caeli* de Cantanhede, agradeço, pelos bons momentos, amizade e pelas 3 horas semanais a partilhar o que mais gosto de fazer... CANTAR. E como disse Friedrich Nietzsche: "*Sem a música, a vida seria um erro.*"

A todos do fundo do coração: OBRIGADA!

palavras-chave

Semente de azeitona, óleo, ácido gordo, triacilglicerol, lípido polar, lipidómica, cromatografia, espetrometria de massa, atividade antibacteriana, subproduto agroindustrial.

resumo

Em Portugal, as indústrias de azeite e azeitona de mesa têm uma importância económica elevada. Estas indústrias produzem grandes quantidades de resíduos derivados do processamento da azeitona como o bagaço e os caroços. As sementes de azeitona contidas nestes subprodutos podem e devem ser recuperadas e reutilizadas para uma produção sustentável de novos compostos e produtos. As sementes de frutos e os seus óleos são ricos em ácidos gordos (FAs) mono e polinsaturados, e são fonte de fitosteróis e antioxidantes. Além destes, têm fosfolípidos e glicolípidos, que têm sido associados a diversas atividades biológicas, mas cujo perfil e atividade têm sido pouco explorados, principalmente na azeitona e seus derivados.

O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil lipídico do óleo de sementes de azeitona como fonte promissora de lípidos com potenciais aplicações biotecnológicas, utilizando a variedade Arbequina como cultivar de alto valor agregado.

Para tal, utilizaram-se técnicas de cromatografia e espectrometria de massa (MS) para caracterizar o perfil de FAs totais, de triacilgliceróis (TAGs), e dos lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos e outros). Em primeiro lugar, começou-se por extrair os lípidos totais para a obtenção do óleo e fez-se de seguida o seu fracionamento e caracterização. Uma primeira análise do extrato total da amostra por TLC permitiu verificar que os TAGs são os componentes mais abundantes do óleo. A análise dos FAs totais nesse extrato lipídico por GC-MS permitiu verificar que os ácidos oleico, linoleico e palmítico são predominantes nesta matriz. Depois, o óleo de sementes de azeitona foi fracionado em três frações: lípidos neutros, de polaridade intermédia e polares. Neste trabalho, o processo de fracionamento do óleo para obtenção de frações enriquecidas em lípidos polares foi otimizado com recurso a diferentes sistemas de solventes e misturas de padrões de lípidos, com o fim de recuperar a totalidade dos lípidos polares. A análise da fração enriquecida em lípidos neutros permitiu analisar o perfil de TAGs por ESI-Q-ToF-MS com injeção direta e identificar um total de trinta e três espécies moleculares. A análise da fração dos lípidos polares por HILIC-ESI-MS/MS de alta resolução permitiu, pela primeira vez, a identificação do perfil de lípidos polares de sementes de azeitona. No total foram identificadas cento e vinte e nove espécies moleculares: setenta e sete correspondendo a fosfolípidos, trinta e três a glicolípidos, quatro a esteróis glicosilados acilados e quinze a esfingolípidos. De entre os lípidos polares identificados alguns estão reportados na literatura como possíveis lípidos bioativos. A fração do óleo de sementes de azeitona rica em lípidos polares não demonstrou atividade antibacteriana nas concentrações testadas.

As sementes de azeitona podem ser valorizadas como subproduto agro-industrial, e podem ser exploradas como ingrediente ou matéria-prima para as indústrias alimentar, nutracêutica, cosmética, farmacêutica e de ração animal. Para um trabalho futuro poderão ser estudadas em maior detalhe as propriedades bioativas deste óleo e das suas frações lipídicas, para investigar o seu potencial bioativo.

keywords

Olive seed, oil, fatty acid, triacylglycerol, polar lipid, lipidomics, chromatography, mass spectrometry, antibacterial activity, agroindustrial byproduct.

abstract

In Portugal, the olive oil and table olive industries are of high economic importance. These industries produce large amounts of olive processing waste such as the olive pomace and the olive stones. The olive seeds, contained in these by-products, can and should be recovered and reused for the sustainable production of new compounds and products. Fruit seeds and their oils are rich in mono- and polyunsaturated fatty acids (FAs) and are a source of phytosterols and antioxidants. In addition, they have phospholipids and glycolipids, which have been associated with various biological activities, but whose profile and activity have been little explored, especially in olives and their derivatives.

The objective of this work was to study the lipid profile of olive seed oil as a promising source of lipids with potential biotechnological applications, using the Arbequina variety as a high added value cultivar.

For this purpose, chromatography and mass spectrometry techniques (MS) were used to characterize the profile of total FAs, triacylglycerols (TAGs), and polar lipids (phospholipids, glycolipids and others). First, the total lipids were extracted to obtain the oil and, then, fractionated and characterized. A first analysis of the total lipid extract by TLC showed that TAGs are the most abundant components of the oil. Analysis of total FAs in this lipid extract, by GC-MS, showed that oleic, linoleic and palmitic acids are predominant in this matrix. Then, the olive seed oil was fractionated into three fractions: neutral lipids, intermediate polarity lipids and polar lipids. In this work, the oil fractionation process to obtain polar lipid enriched fractions was optimized using different solvent systems and lipid standard mixtures in order to fully recover the polar lipids. The analysis of the neutral lipid enriched fraction allowed studying the TAGs profile by direct injection ESI-Q-ToF-MS and identifying a total of thirty-three molecular species. The analysis of the polar lipid fraction by high resolution HILIC-ESI-MS/MS allowed the identification of the polar lipid profile of olive seeds, for the first time. In total, one hundred and twenty-nine molecular species were identified: seventy-seven corresponding to phospholipids, thirty-three to glycolipids, four to acylated sterol glycosides and fifteen to sphingolipids. Among the identified polar lipids, some are reported in the literature as possible bioactive lipids. The polar lipid-rich fraction of the olive seed oil showed no antibacterial activity at the concentrations tested.

Olive seeds can be valued as an agroindustrial by-product and can be exploited as an ingredient or raw material for the food, nutraceutical, cosmetic, pharmaceutical and animal feed industries. For future work, the bioactive properties of this oil and its lipid fractions could be studied in more detail to investigate its bioactive potential.

Índice

Índice de Figuras	I
Índice de Tabelas	IV
Lista de siglas e abreviaturas	VI
1. Introdução.....	1
1.1. Sementes de frutos e seu óleo: de subprodutos da indústria agroalimentar a novos alimentos funcionais.....	1
1.1.1. Sementes de azeitona e seu óleo.....	2
1.2. Composição química e teor lipídico das sementes de frutos	5
1.2.1. Perfil lipídico de sementes de azeitona e de outras sementes de frutos	7
1.2.1.1. Lípidos majoritários: ácidos gordos e triacilgliceróis	7
1.2.1.2. Lípidos minoritários: lípidos polares	19
1.3. Metodologias de análise de lípidos em óleos de sementes de frutos.....	25
1.4. Propriedades bioativas dos óleos de sementes de frutos e potenciais aplicações biotecnológicas	30
1.5. Objetivo	34
2. Material e Métodos.....	35
2.1. Material, reagentes e equipamento	35
2.2. Amostras	36
2.3. Extração total de lípidos para obtenção do óleo de sementes	37
2.4. Separação das principais classes de lípidos do óleo de sementes	37
2.5. Quantificação de fosfolípidos.....	38
2.6. Quantificação de glicolípidos	39
2.7. Análise do perfil de ácidos gordos totais.....	40
2.7.1. Análise estatística dos dados	41
2.7.2. Determinação de índices lipídicos.....	41
2.8. Otimização do processo de fracionamento do óleo de sementes para aumentar a eficiência da recuperação dos lípidos polares	41
2.8.1. Preparação de uma mistura de padrões de lípidos polares	42
2.8.2. Fracionamento da mistura de padrões de lípidos polares por extração em fase sólida com diferentes sistemas de solventes	42
2.8.3. Quantificação de fosfolípidos nas frações enriquecidas em lípidos polares	

2.8.4.	Cromatografia em camada fina das frações enriquecidas em lípidos polares	44
2.8.5.	Quantificação de fosfolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina das frações enriquecidas em lípidos polares com os diferentes eluentes	44
2.8.6.	Preparação do novo sistema de solventes e avaliação da recuperação de lípidos polares após extração em fase sólida da mistura de padrões de lípidos polares	45
2.9.	Fracionamento do óleo de sementes de azeitona em lípidos neutros, lípidos de polaridade intermédia e lípidos polares	46
2.10.	Análise da fração enriquecida em lípidos neutros	47
2.10.1.	Determinação da massa de lípidos neutros.....	47
2.10.2.	Análise do perfil de triacilgliceróis	48
2.11.	Análise da fração enriquecida em lípidos polares	48
2.11.1.	Quantificação de fosfolípidos e de glicolípidos	49
2.11.2.	Cromatografia em camada fina.....	49
2.11.2.1.	Quantificação de fosfolípidos e de glicolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina	49
2.11.3.	Análise do perfil molecular de lípidos polares	49
2.11.4.	Análise dos dados	50
2.12.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos lípidos polares	51
2.12.1.	Preparação de meios de cultura e solução-tampão	51
2.12.2.	Estirpe bacteriana, condições de crescimento e preparação do inóculo	52
2.12.3.	Padrões de lípidos polares e extratos lipídicos testados	52
2.12.4.	Determinação da concentração mínima inibitória pelo ensaio da microdiluição em caldo	53
2.12.5.	Análise estatística dos dados	53
3.	Resultados	54
3.1.	Obtenção do óleo de sementes de azeitona	54
3.2.	Separação das classes de lípidos que compõem o óleo	54
3.3.	Perfil de ácidos gordos totais.....	56
3.3.1.	Índices lipídicos.....	57
3.4.	Estimativa da quantidade de fosfolípidos e de glicolípidos no óleo de sementes de azeitona.....	58
3.5.	Otimização do processo de fracionamento do óleo por extração em fase sólida para a recuperação eficiente dos lípidos polares.....	58

3.5.1. Quantificação de fosfolípidos nas frações enriquecidas em lípidos polares obtidas nos três processos testados com a mistura de padrões.....	59
3.5.2. Análise qualitativa das classes de lípidos polares recuperadas nas frações enriquecidas obtidas nos três processos testados	59
3.5.3. Quantificação das classes de fosfolípidos recuperadas e separadas por cromatografia em camada fina nos três processos testados	61
3.6. Avaliação da recuperação de lípidos polares por extração em fase sólida da mistura de padrões com o novo sistema de solventes.....	62
3.6.1. Análise qualitativa das classes de lípidos polares recuperadas	62
3.6.2. Análise quantitativa das classes de lípidos polares recuperadas e separadas por cromatografia em camada fina.....	64
3.7. Fracionamento do óleo de sementes de azeitona por extração em fase sólida com o processo otimizado para a recuperação eficiente dos lípidos polares.....	65
3.8. Perfil de triacilgliceróis	67
3.9. Perfil de lípidos polares	70
3.9.1. Quantificação de fosfolípidos e glicolípidos nas frações enriquecidas	70
3.9.2. Análise qualitativa dos lípidos polares por cromatografia em camada fina	71
3.9.3. Quantificação de fosfolípidos e glicolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina	72
3.9.4. Identificação e quantificação relativa dos lípidos polares por HPLC-ESI-MS/MS	74
3.9.4.1. Glicerofosfolípidos.....	85
3.9.4.2. Gliceroglicolípidos	88
3.9.4.3. Esteróis glicosilados acilados derivados de sitosterol.....	90
3.9.4.4. Esfingolípidos.....	91
3.10. Atividade antimicrobiana de lípidos polares	94
4. Discussão.....	97
5. Conclusão.....	112
6. Referências bibliográficas	113

Índice de Figuras

Figura 1. Azeitonas Arbequinas.	3
Figura 2. Estrutura geral de um ácido gordo.	7
Figura 3. Fórmulas de cálculo do índice de aterogenicidade (A) e do índice de trombogenicidade (B) de um alimento determinados com base no perfil de ácidos gordos totais.	8
Figura 4. Estrutura geral de um triacilglicerol (projeção de Fischer).	10
Figura 5. Estrutura geral de um fosfolípido.	20
Figura 6. Classes de fosfolípidos comumente presentes em sementes de frutos.	21
Figura 7. Classes de glicolípidos e esfingolípidos comumente presentes em sementes de frutos.	23
Figura 8. Estrutura química de um esteroil glicosilado acilado (ASG).	24
Figura 9. Cromatografia em camada fina do óleo de sementes de azeitona Arbequina, de duas regiões geográficas de Nelas, de dez réplicas biológicas (ω_1 , ω_2 , ω_3 , ω_4 e ω_5 , relativas a Canas de Senhorim; e ρ_1 , ρ_2 , ρ_3 , ρ_4 e ρ_5 , relativas a Oliveira de Barreiros).	55
Figura 10. Cromatografia em camada fina das frações obtidas por SPE enriquecidas em lípidos polares da mistura de padrões.	60
Figura 11. Cromatografia em camada fina das frações enriquecidas em lípidos polares da mistura de padrões com o novo sistema de solventes.	64
Figura 12. Espectro de ESI-MS de triacilgliceróis (TAGs), presentes no óleo de sementes de azeitona, após a análise da fração obtida por extração em fase sólida enriquecida em lípidos neutros, em que os TAGs se observam como iões $[M+NH_4]^+$	67

Figura 13. Espectros de ESI-MS/MS de TAGs como iões $[M+NH_4]^+$: (A) com m/z 902.9, correspondente ao TAG(54:3), (B) com m/z 876.9, correspondente ao TAG (52:2) e (C) com m/z 900.9, correspondente ao TAG (54:4), obtidos após a análise da fração de lípidos neutros obtida por extração em fase sólida. 70

Figura 14. Cromatografia em camada fina da fração de lípidos polares do óleo de sementes de azeitona Arbequina, de duas regiões geográficas de Nelas, de quatro réplicas biológicas ($\omega 3$ e $\omega 5$, relativas a Canas de Senhorim; e $\rho 1$ e $\rho 5$, relativas a Oliveira de Barreiros), obtida após extração em fase sólida. 72

Figura 15. Cromatogramas de corrente iónica total da fração enriquecida em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona Arbequina nos modos de ionização positiva (A) e negativa (B) obtidos por HILIC-ESI-MS. 75

Figura 16. Espectros de LC-MS das diferentes classes de glicerofosfolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina no modo de ionização positiva para (i) PC, (ii) LPC, (iii) PE, (iv) NAPE, e no modo de ionização negativa para (v) PG, (vi) PA, e (vii) PI. 86

Figura 17. Espectros de LC-MS/MS das diferentes classes de glicerofosfolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina, no modo de ionização positivo, com a estrutura molecular representativa de cada classe lipídica. (A) PC(36:2) a m/z 786.6041 como $[M+H]^+$; (B) LPC(18:1) a m/z 522.5950 como $[M+H]^+$ e (C) PE(36:2) a m/z 744.5544 como $[M+H]^+$ 87

Figura 18. Espectros de LC-MS/MS das diferentes classes de glicerofosfolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina, no modo de ionização negativa, como $[M-H]$, com uma estrutura molecular representativa de cada classe lipídica. (D) PE(36:2) a m/z 742.5368; (E) NAPE(54:4) a m/z 1004.7717; (F) PG(34:1) a m/z 747.5098; (G) PA(36:2) a m/z 699.4980; (H) LPA(16:0) a m/z 409.2625 e (I) PI(34:1) a m/z 835.5293. 88

Figura 19. Espectros de LC-MS das diferentes classes de gliceroglicolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina. (viii) SQDG, no modo de ionização negativa, e (ix) MGDG e (x) DGDG no modo de ionização positiva. 89

Figura 20. Espectros de LC-MS/MS das diferentes classes de glicero­glicólí­pidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina no modo de ionização negativa e positiva com uma estrutura molecular representativa de cada classe lipídica. (J) SQDG(36:2) a m/z 845.5403 como $[M-H]^-$; (K) MGDG(36:2) a m/z 800.6253 como $[M+NH_4]^+$ e (L) DGDG(36:2) a m/z 962.6777 como $[M+NH_4]^+$	90
Figura 21. Espectro de LC-MS da classe de esteróis glicosilados acilados identifi­cados no óleo de sementes de azeitona Arbequina, no modo de ionização positiva, como iões $[M+NH_4]^+$	91
Figura 22. Espectro de LC-MS/MS do ião $[M+NH_4]^+$ do ASG(18:1-Glc-Sitosterol) a m/z 858.7189 identificado no óleo de sementes de azeitona Arbequina, com a respetiva estrutura molecular.	91
Figura 23. Espectros de LC-MS/MS de hexosilceramida (HexCer) e de ceramida (Cer) identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina no modo de ionização positiva como $[M+H]^+$ e respetiva estrutura molecular. (M) HexCer(t34:2) a m/z 714.55; (N) Cer(t41:1(OH)) a m/z 668.62.....	92
Figura 24. Atividade antimicrobiana dos padrões de lípidos avaliada pelo método de microdiluição em caldo contra a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meti­cilina (estirpe DSM 25693).	95
Figura 25. Atividade antimicrobiana das frações enriquecidas em lípidos polares obtidas a partir do óleo de sementes de azeitona avaliada pelo método de microdiluição em caldo contra a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meti­cilina (estirpe DSM 25693).	96

Índice de Tabelas

Tabela 1. Aplicações industriais atuais e futuras de sementes de azeitona	4
Tabela 2. Composição química da semente de azeitona (em % de peso seco)	5
Tabela 3. Teor lipídico (g/100 g) de diferentes sementes de frutos	6
Tabela 4. Percentagem de ácidos gordos livres em óleos de sementes de frutos	10
Tabela 5. Perfil de ácidos gordos (g/100 g) de óleos de sementes de frutos	12
Tabela 6. Perfil de triacilgliceróis dos óleos de sementes de frutos	17
Tabela 7. Atividade antioxidante de alguns óleos de sementes de frutos.....	31
Tabela 8. Valores da massa de óleo de sementes de azeitona Arbequina obtidas de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal) e rendimento em óleo após extração lipídica.....	54
Tabela 9. Perfil de ácidos gordos do óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal) e valores de <i>p</i> da análise de variância com um fator (<i>one-way</i> ANOVA)	56
Tabela 10. Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) do óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal)	57
Tabela 11. Estimativa de fosfolípidos (PL) e de glicolípidos (GL) no óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal)	58
Tabela 12. Quantidade de fosfolípido (PL) total recuperado após extração em fase sólida (SPE) e percentagem de recuperação de PLs com os processos 1, 2 e 3 da otimização do fracionamento da mistura de padrões de lípidos polares (<i>n</i> =1).....	59
Tabela 13. Estimativa das classes de fosfolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina nos três processos testados	62

Tabela 14. Recuperação das classes de fosfolípidos presentes na mistura equimolar de padrões de lípidos polares comerciais utilizada para a extração em fase sólida com o novo sistema de solventes	65
Tabela 15. Composição lipídica do óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal) em grupos de lípidos, consoante a sua polaridade, em percentagem.....	66
Tabela 16. Espécies moleculares de triacilgliceróis identificadas por ESI-Q-ToF-MS/MS como aductos de $[M+NH_4]^+$	68
Tabela 17. Quantidade de fosfolípidos e de glicolípidos no óleo de sementes de azeitona e percentagem de recuperação após fracionamento por extração em fase sólida.....	71
Tabela 18. Percentagem de cada classe de fosfolípido e de glicolípido ou glucósido no óleo de sementes de azeitona Arbequina obtida após a quantificação de fósforo e de glucose nas respetivas bandas separadas por cromatografia em camada fina do extrato de lípidos polares recuperado por extração em fase sólida	73
Tabela 19. Massa e percentagem de cada classe de fosfolípido e de glicolípido ou glucósido no óleo de sementes de azeitona Arbequina	73
Tabela 20. Espécies moleculares de lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos, esteróis glicosilados acilados e esfingolípidos) identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina por HILIC-ESI-MS e HILIC-ESI-MS/MS	76
Tabela 21. Abundância relativa (em %) das classes de lípidos polares identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina por HPLC-ESI-MS/MS	93

Lista de siglas e abreviaturas

A	Ácido araquídico
AA	Ácido araquidônico
Acil-MGMG	Acil-monogalactosilmonoacilglicerol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASG	Esterol glicosilado acilado (do inglês, <i>acylated sterol glucoside</i>)
B	Ácido beénico
BHA	Hidroxianisol butilado (do inglês, <i>butylated hydroxyanisole</i>)
C_{17:0}	Ácido heptadecanóico
C_{17:1}	Ácido heptadecenóico
CE	Éster de colesterol (do inglês, <i>cholesterol ester</i>)
Cer	Ceramida
CL	Cardiolipina
C:N	Número de carbonos:número de ligações duplas
Col	Colesterol
DAG	Diacilglicerol
DGDG	Digalactosildiácilglicerol
DGMG	Digalactosilmonoacilglicerol
DGTS	Diacilgliceril- <i>N,N,N</i> -trimetil-homoserina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DPPH•	radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
ESI	Ionização por electrospray (do inglês, <i>electrospray ionization</i>)
EC₅₀	Concentração efetiva a 50% (do inglês, <i>effective concentration at 50%</i>)
ESI-MS	Ionização por electrospray acoplada a espectrometria de massa (do inglês, <i>electrospray ionization-mass spectrometry</i>)
FA	Ácido gordo (do inglês, <i>fatty acid</i>)
FAME	Éster metílico de ácido gordo (do inglês, <i>fatty acid methyl ester</i>)
FID	Detetor de ionização de chama (do inglês, <i>flame ionization detector</i>)
G	Ácido gadoleico
GalCer	Galactosilceramida

GC-FID	Cromatografia de fase gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (do inglês, <i>gas chromatography-flame ionization detection</i>)
GC-MS	Cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês, <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>)
GL	Glicolípido
GluCer	Glucosilceramida
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>high density lipoprotein</i>)
HexCer	Hexosilceramida
HILIC	Cromatografia líquida com interação hidrofílica (do inglês, <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPLC-ESI-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray (do inglês, <i>high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-mass spectrometry</i>)
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray (do inglês <i>high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>)
IA	Índice de aterogenicidade
IT	Índice de trombogenicidade
iNOS	Sintase induzida pelo óxido nítrico (do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
L	Ácido linoleico
La	Ácido láurico
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês, <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem (do inglês, <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>low density lipoprotein</i>)

LLE	Extração líquido/líquido (do inglês, <i>liquid/liquid extraction</i>)
Ln	Ácido linolénico
LPA	Ácido lisofosfatídico (do inglês, <i>lysophosphatidic acid</i>)
LPC	Lisofosfatidilcolina (do inglês, <i>lysophosphatidylcholine</i>)
LPE	Lisofosfatidiletanolamina (do inglês, <i>lysophosphatidylethanolamine</i>)
LPI	Lisofosfatidilinositol (do inglês, <i>lysophosphatidylinositol</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Ácido mirístico
MAG	Monoacilglicerol
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, <i>matrix assisted laser desorption ionization</i>)
MGDG	Monogalactosildiacilglicerol
MGTS	Monoacilgliceril- <i>N,N,N</i> -trimetil-homoserina
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês, <i>minimum inhibitory concentration</i>)
MS	Espectrometria de massa (do inglês, <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massa tandem (do inglês, <i>tandem mass spectrometry</i>)
MUFA	Ácido gordo monoinsaturado (do inglês, <i>monounsaturated fatty acid</i>)
<i>n-3</i>	Ácido gordo ómega-3
<i>n-6</i>	Ácido gordo ómega-6
<i>n-9</i>	Ácido gordo ómega-9
NACE	Eletroforese capilar não-aquosa (do inglês, <i>non-aqueous capillary electrophoresis</i>)
NAPE	<i>N</i> -acil-fosfatidiletanolamina (do inglês, <i>N-acyl-phosphatidylethanolamine</i>)
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>nitric oxide</i>)
O	Ácido oleico
P	Ácido palmítico
PA	Ácido fosfatídico (do inglês, <i>phosphatidic acid</i>)
PBS	Solução-tampão fosfato (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>)
PC	Fosfatidilcolina (do inglês, <i>phosphatidylcholine</i>)

PE	Fosfatidiletanolamina (do inglês, <i>phosphatidylethanolamine</i>)
PG	Fosfatidilglicerol (do inglês, <i>phosphatidylglycerol</i>)
PI	Fosfatidilinositol (do inglês, <i>phosphatidylinositol</i>)
PL	Fosfolípido (do inglês, <i>phospholipid</i>)
Po	Ácido palmitoleico
Ppm	Parte por milhão
PS	Fosfatidilserina (do inglês, <i>phosphatidylserine</i>)
PUFA	Ácido gordo polinsaturado (do inglês, <i>polyunsaturated fatty acid</i>)
Q-TOF	Quadrupolo com tempo de voo (do inglês, <i>quadrupole-time-of-flight</i>)
R_f	Fator de retenção (do inglês, <i>retention factor</i>)
S	Ácido esteárico
SFA	Ácido gordo saturado (do inglês, <i>saturated fatty acid</i>)
SG	Esterol glucósido (do inglês, <i>sterol glucoside</i>)
SM	Esfingomielina (do inglês, <i>sphingomyelin</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>solid-phase extraction</i>)
SQDG	Sulfoquinovosildiacilglicerol
SQMG	Sulfoquinovosilmonoacilglicerol
TAG	Triacilglicerol
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês, <i>thin-layer chromatography</i>)
TSA	Ágar triptona de soja (do inglês, <i>trypticase soy agar</i>)
TSB	Caldo de soja tripticase (do inglês, <i>trypticase soy broth</i>)
UFA	Ácido gordo insaturado (do inglês, <i>unsaturated fatty acid</i>)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês, <i>very low density lipoprotein</i>)

1. Introdução

1.1. Sementes de frutos e seu óleo: de subprodutos da indústria agroalimentar a novos alimentos funcionais

Anualmente, milhões de toneladas de subprodutos das indústrias transformadoras de fruta são descartadas na forma de caroços ou sementes (1,2). A fim de reduzir o impacto ambiental negativo do processamento industrial, esses subprodutos devem ser recuperados e reutilizados para uma produção sustentável de novos produtos de valor agregado. Entre estes subprodutos incluem-se as sementes da fruta que podem ser utilizadas para a obtenção de compostos fitoquímicos ou óleos com potenciais aplicações industriais (3). Ao mesmo tempo, nos últimos anos, nos países ocidentais, a utilização de sementes na alimentação humana tem aumentado, devido à procura de hábitos alimentares saudáveis pela população. As sementes e os óleos de sementes mais utilizados para o consumo são as de linhaça, chia, sésamo, papoila, girassol e abóbora (4). Estas sementes são utilizadas tanto na alimentação como em produtos de cuidados de saúde e bem-estar, associadas a efeitos benéficos para a saúde. Em geral, estas sementes são importantes fontes de matérias-primas ou compostos com valor nutricional, tais como fibras, e de lípidos e proteínas, que são, respetivamente, fontes de ácidos gordos (FAs, do inglês, *fatty acids*) e aminoácidos essenciais, com utilização em alimentos funcionais e nutracêuticos (5). Os alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que, quando consumidos regularmente, produzem um efeito benéfico para a saúde, além das suas propriedades nutricionais básicas. Normalmente, esses alimentos contêm diferentes quantidades e tipos de compostos bioativos (6–8). Por outro lado, os nutracêuticos são suplementos dietéticos que fornecem uma forma concentrada de compostos bioativos de alimentos, presentes numa matriz não-alimentar, e são usados com o propósito de melhorar a saúde em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas a partir de alimentos normais (9). Os nutracêuticos são normalmente consumidos em apresentações farmacêuticas, como comprimidos ou cápsulas (10).

As sementes são componentes importantes na dieta humana. Representam uma forma concentrada de energia (11), que se deve também à sua percentagem em lípidos (3). As sementes de chia (*Salvia hispanica*) e de linhaça (*Linum usitatissimum*), por exemplo, são reconhecidas pela abundância em FAs essenciais ómega-3 ($n-3$), nomeadamente ácido α -linolénico (18:3 $n-3$), que representa cerca de 70% e 50% dos seus FAs totais, respetivamente (5).

As sementes de frutos e seus óleos são também fontes de lípidos bioativos, como FAs essenciais ômega-6 (*n*-6) e *n*-3, fitosteróis, carotenóides, esqualeno, fosfolípidos (PL, do inglês, *phospholipid*) e glicolípidos (GL) (12). Várias sementes atualmente descartadas na indústria agroalimentar, como as de melancia, melão, groselha, romã, uva e maçã, são potenciais alimentos funcionais e ingredientes para formulações nas indústrias cosmética, farmacêutica e nutracêutica, e têm sido estudadas nesse sentido (12). No entanto, novas sementes funcionais e seus óleos poderão ser recuperados a partir de subprodutos da agroindústria e usados para vários fins comerciais, como é o caso das sementes de azeitona (*Olea europaea*) (13).

1.1.1. Sementes de azeitona e seu óleo

Em Portugal e nos países mediterrânicos, existem duas indústrias transformadoras de azeitona que têm uma importância económica elevada: as indústrias do azeite e da azeitona de mesa. Estes produtos alimentares são ingredientes básicos da Dieta Mediterrânica e são consumidos como fonte de gordura saudável.

A produção de azeite e de azeitona de mesa tem predominância em Espanha, Turquia, Itália, Egito, Marrocos e Grécia (14). Na campanha de 2018/2019, estima-se que tenham sido produzidas 2.219 e 3.131 toneladas de azeite na Europa e no mundo, respetivamente (15). A produção de azeitona de mesa a nível europeu e mundial teve uma previsão de 865,5 e 2.751,5 toneladas, respetivamente (16). Em Portugal, a produção de azeite e azeitona de mesa para a campanha de 2018/2019 foi de 17,8 e 115,0 toneladas, respetivamente (15,16).

No nosso país, a área de olival representa cerca de 352.000 hectares (17). Os maiores domínios de olival encontram-se na região do Alentejo, que representa cerca de 50% da área total de olivicultura, seguida de Trás-os-Montes (22%), região Centro (18%), Ribatejo (7,7%) e Algarve (2,3%). Cerca de 97,5% da área total de superfície é usada para produzir azeitonas para extração de azeite, enquanto o restante é utilizado para a produção de azeitonas de mesa. Existem duas variedades portuguesas principais de azeitona, a Galega Vulgar e a Cobrançosa, que existem em quase todas as regiões olivícolas. Para além destas variedades tradicionais portuguesas, há outras cultivares estrangeiras que têm vindo a assumir uma importância elevada, como a Arbequina, a Picual e a Arbosana (17), que são de origem espanhola.

Nos últimos anos, foram plantados na região do Alentejo novos olivais em regime super intensivo, cobrindo aproximadamente 40% da área, com várias variedades

distintas de oliveira, entre elas a conhecida variedade Arbequina (*Olea europaea* L. cv. *Arbequina*) (Figura 1) (17). A Arbequina é uma variedade espanhola, autóctone das regiões da Catalunha (Tarragona e Lleida) e de Alto Aragão (18), que representa 55.000 hectares de olival em Espanha (19). As azeitonas Arbequinas são utilizadas para produção de azeitona de mesa e de azeite (20). Estas azeitonas são pequenas mas altamente valorizadas por apresentarem elevada produtividade e por ser a variedade de azeitona com maior taxa de extração de óleo (20), cerca de 22-27% (21). Por essa razão é uma das variedades mais cultivadas no mundo (Europa, Norte e Sul da América, e Austrália), incluindo Portugal, onde é cultivada em regiões tão diversas como Trás-os-Montes, Alentejo e Beira Alta.

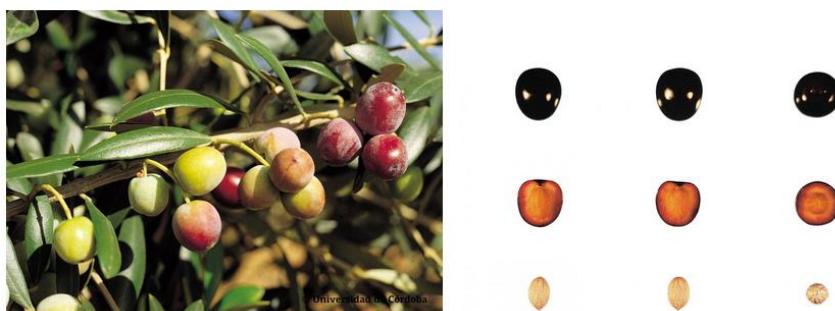


Figura 1. Azeitonas Arbequinas (18).

Com os atuais regimes de produção intensiva e super intensiva de azeitona, as indústrias transformadoras e os lagares geram grandes quantidades de resíduos, nomeadamente bagaço de azeitona e caroços de azeitona. Em Portugal, nos anos de 2000 a 2004, foram produzidas, a partir dessas indústrias, cerca de 59.121 toneladas de bagaço de azeitona (22). Os Estados Unidos da América, em 2011, produziram cerca de 13 mil milhões de caroços de azeitona (23). Estes subprodutos contêm as sementes de azeitona que fazem parte do caroço do fruto.

Embora pouco estudadas, as sementes de azeitona têm vindo a ganhar alguma relevância no sector oleícola no sentido de rentabilizar o seu potencial biotecnológico. Isto inclui as sementes de azeitona intactas e outros componentes obtidos a partir delas para criar novos produtos com alto valor agregado (24). Em Espanha, foi desenvolvida recentemente uma tecnologia promissora que permite recuperar as sementes inteiras a partir de caroços de azeitona (24). Na referida tecnologia, os caroços descartados após preparação do fruto descaroçado passam por um rigoroso processo de limpeza e triagem, conseguindo-se recuperar mais de 99% das sementes. É, assim, possível obter

1,25 toneladas de sementes intactas a partir de 25 toneladas de caroços de azeitona, tornando-se uma alternativa viável e produtiva ao seu descarte como resíduo (24). As sementes obtidas são utilizadas para a produção de snacks, farinha de sementes, e óleo de sementes, como matérias-primas para a indústria alimentar e cosmética (24). Sugere-se que as sementes de azeitona sejam consumidas como um aperitivo saudável, como cobertura para produtos doces e salgados, ou usadas como farinha na massa de pão e derivados (24). Além disso, o óleo de sementes de azeitona tem sido sugerido como uma alternativa ao azeite e como ingrediente para formulações cosméticas, como sabonetes e cremes (24). As sementes de azeitona têm sido assim consideradas como uma fonte promissora de lípidos para várias aplicações biotecnológicas (13), contribuindo para outros usos não alimentares (Tabela 1).

Devido à contínua expansão da indústria alimentar, as sementes de frutos, nomeadamente de azeitona, representam uma fonte potencial e sustentável de óleo. Assim, há necessidade de obter mais informação sobre o teor de óleo e a sua composição química, para sustentar os usos mais adequados destas matrizes, sob o ponto de vista económico e de eficiência sustentável.

Tabela 1. Aplicações industriais atuais e futuras de sementes de azeitona

Aplicação	Setor de aplicação	Uso	Subproduto e usos úteis
Bio-óleo	Amplo campo de indústrias	Hoje em dia em uso	-
Óleo de semente de azeitona	Indústria alimentar, farmacológica e cosmética	Hoje em dia em uso	-
Furfural	Amplo campo de indústrias como solvente	Usado no passado	Hidrolisado/fertilizante
Alimentação animal	Alimentação	Uso potencial	-
Resinas	Eletroquímica	Uso potencial	Combustível
Fracionamento	Alimentação, cosméticos, farmacêuticos, álcool	Uso potencial	Fonte de proteína e açúcar/ração animal ou fertilizante

Fonte: referência (25).

1.2. Composição química e teor lipídico das sementes de frutos

O valor agregado das sementes de frutos como subprodutos e o seu uso potencial para a produção de óleos dependem da sua composição química. O estudo da composição química das sementes é essencial por diversas razões. As sementes são fontes básicas na nutrição humana e animal; são uma importante fonte de produtos naturais para formulações químicas; e contêm reservas alimentares e substâncias de crescimento, importantes para uso industrial. As sementes acumulam grandes quantidades de substâncias químicas sob a forma de reservas energéticas das plantas e frutos (26). Em termos gerais, as sementes de frutos são constituídas por água, proteínas, carboidratos, lípidos, cinzas, fibras e minerais (27). A composição química das sementes é determinada por fatores genéticos, ambientais, agronômicos, e varia de acordo com a espécie (origem botânica) e também com a parte anatômica da semente (26).

As azeitonas são constituídas por três partes anatomicamente distintas: a pele, chamada epicarpo (cerca de 1,00-3,00% do fruto inteiro); a polpa, denominada de mesocarpo (cerca de 70-80%), e o caroço, denominado endocarpo lenhoso (cerca de 18-22%) que contém a semente (28). A semente da azeitona é quimicamente constituída por água, proteínas, lípidos, açúcares livres, fibras e polifenóis (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química da semente de azeitona (em % de peso seco)

Componentes	%
Água	30,00
Cinzas	1,50-2,67
Celulose	1,90
Lípidos	27,30-53,00
Proteínas	10,20-17,20
Fibra total	47,60
Fibra insolúvel	32,70
Açúcares	26,60
Polifenóis	0,50-1,00
Carboidratos	2,13
Indeterminados	2,40

Fonte: referências (29–31).

Os lípidos representam uma porção significativa da composição química das sementes de frutos e também da semente de azeitona (Tabelas 2 e 3). O teor de óleo de diferentes sementes de frutos varia entre 0,60% (pêssego) (27) e 45,20-53,40% (alperce)

(3). Na maioria destas sementes, o teor de óleo encontra-se abaixo ou próximo de 30%, mas nas sementes de alperce e de melancia é substancialmente superior (cerca de 50%). Por outro lado, as sementes de azeitona também apresentam altos teores de óleo (27,3-53%) (29–31).

Tabela 3. Teor lipídico (g/100 g) de diferentes sementes de frutos

Amostras	Teor lipídico	Referência
Abacate	1,87	(32)
Abóbora	42,00-45,00	(33,34)
Alperce	45,20-53,40	(3)
Ameixa	11,60	(27)
Amendoim	38,30	(3)
Amora	1,05	(35)
Azeitona	27,30-53,00	(29–31)
Cereja	14,50	(27)
Figo-da-Índia	6,19	(36)
Goiaba	12,60	(37)
Kiwi	30,00	(37)
Laranja	32,00-35,00	(33,38)
Maçã (cv. <i>red Fuji</i>)	20,90-29,10	(39–42)
Manga	4,92-13,00	(43)
Marmelo	16,90	(3)
Melancia	50,00	(44)
Mirtilo	7,60-22,20	(45)
Nectarina	11,00	(27)
Papaia	30,00-34,00	(46,47)
Pêra (cv. <i>Dangshan Suli</i>)	17,90	(39)
Pêssego	0,60	(27)
Romã	5,09-15,22	(48)
Sabugueiro	1,59	(35)
Uva	8,00-15,00	(33,49)

Além do teor de óleo, a qualidade do óleo varia consoante o tipo de semente, a sua composição, tamanho e forma (11). A composição em FAs e em triacilgliceróis (TAGs) é importante (11) uma vez que estes são os lípidos maioritários, embora seja também importante a composição em outros lípidos, como esteróis, PLs e GLs, como será discutido mais adiante.

1.2.1. Perfil lipídico de sementes de azeitona e de outras sementes de frutos

Uma vez que a composição lipídica de várias sementes de frutos, nomeadamente das sementes de azeitona, é aproximadamente um terço da sua composição, será necessário conhecer o perfil de lípidos destas matrizes para compreender o impacto positivo do seu consumo na saúde e nutrição humanas e a sua utilização noutros usos não alimentares.

1.2.1.1. Lípidos maioritários: ácidos gordos e triacilgliceróis

Os FAs são cadeias de carbono com um grupo metilo numa extremidade da molécula e um grupo carboxilo na outra extremidade (Figura 2) (50). Estes lípidos correspondem a 30-35% do consumo total da energia humana (50).

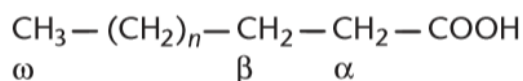


Figura 2. Estrutura geral de um ácido gordo. Nomenclatura dos ácidos gordos: ω – grupo metilo numa extremidade da molécula; α – átomo de carbono adjacente ao grupo carboxilo; β – carbono subsequente. Fonte: referência (50).

As propriedades dos lípidos nos alimentos e nos óleos alimentares dependem da sua composição em FAs, que é relevante devido às implicações benéficas destes lípidos na saúde humana (51). O perfil de FAs destas matrizes permite avaliar a sua composição, estabilidade e valores nutricionais (52). Constatou-se que os ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs, do inglês, *monounsaturated fatty acids*) como o ácido oleico (18:1) e polinsaturados (PUFAs, do inglês, *polyunsaturated fatty acids*) com o ácido linoleico (18:2) são substitutos eficazes dos ácidos gordos saturados (SFAs, do inglês, *saturated fatty acids*) como parte de uma dieta redutora do colesterol (53). Por sua vez, a presença de PUFAs, ou seja, FAs com mais de uma ligação dupla na cadeia carbonada, aumenta as propriedades benéficas potenciais dos óleos (54). Os PUFAs têm um papel essencial na seletividade e na permeabilidade das membranas celulares (55).

Alguns estudos têm demonstrado que os SFAs de cadeia longa aceleram a formação de trombos, tais como o 14:0, o 16:0 e o 18:0, enquanto os MUFAs e os PUFAs não (56–59). Os MUFAs e PUFAs *n-6* e *n-3* são considerados fatores protetores de risco de doenças cardiovasculares. São considerados FAs essenciais, uma vez que o nosso organismo necessita deles mas como não os consegue produzir, devendo, por isso, estar presentes numa alimentação saudável (60).

Os PUFAs *n*-6 são conhecidos por reduzirem o colesterol sérico, e por isso, é recomendado que os SFAs da dieta sejam parcialmente substituídos por PUFAs *n*-6 (61). No entanto, as dietas ricas nesses PUFAs diminuem o nível de lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês, *high density lipoproteins*) que protegem contra a doença cardiovascular, bem como de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês, *low density lipoproteins*) (53,62,63). Vários estudos indicaram que dietas ricas em PUFAs *n*-3 reduzem o nível de LDL e o colesterol sérico total, mas não de HDL (61). No entanto, o colesterol total é reduzido apenas se os níveis iniciais forem altos, pela diminuição das LDL, pelo aumento das HDL e pela diminuição dos TAGs (64). A redução das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, do inglês, *very low density lipoproteins*) é devida a uma redução na taxa de síntese de apolipoproteína B. Esta pode ser a principal influência na aterogênese. Assim, os PUFAs *n*-3 são anti-aterogênicos, mas a sua ação é distinta dos PUFAs *n*-6 (61). Já as dietas ricas em MUFAs são tão eficazes como as dietas ricas em PUFAs na redução do colesterol sérico, mas, por outro lado, os MUFAs não diminuem as HDL (53,62,65,66). Portanto, dietas ricas em 18:1, além do seu efeito nas LDL, podem diminuir a progressão da aterosclerose por formação de LDL e tornam os antioxidantes mais eficazes (61).

Com base no perfil de FAs totais é possível calcular índices de risco desenvolvimento de doença cardiovascular de um alimento, como o índice de aterogenicidade (IA) e o índice de trombogenicidade (IT) (61). Estes índices têm em conta os FAs promotores e protetores de risco de doença cardiovascular. Os FAs promotores da doença são os SFA que são mais aterogênicos (12:0, 14:0, 16:0) e mais trombogênicos (14:0, 16:0 e 18:0). Por outro lado, os FAs protetores de risco de doença cardiovascular são os MUFAs totais e o 18:1 em particular, e os PUFAs *n*-6 e *n*-3 (61). Além disso, os PUFAs *n*-3 são considerados benéficos na fórmula de cálculo do IT (61). Na figura 3, estão representadas as fórmulas para o cálculo dos referidos índices.

(A)	(B)
$\frac{12:0+(4x14:0)+16:0}{P+M+M'}$	$\frac{14:0+16:0+18:0}{0,5xM + 0,5xM' + 0,5x(n-6) + 3x(n-3) + \frac{n-3}{n-6}}$

Figura 3. Fórmulas de cálculo do índice de aterogenicidade (A) e do índice de trombogenicidade (B) de um alimento determinados com base no perfil de ácidos

gordos totais. Fonte: referência (61). Abreviaturas: P, soma de PUFA $n-6$ e $n-3$; M, ácido oleico (18:1); M', soma de outros MUFA; $n-6$, PUFA $n-6$; $n-3$, PUFA $n-3$.

Além de serem importantes na alimentação, os FAs têm aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética, para uso externo. Na indústria farmacêutica, estes compostos são amplamente utilizados em ingredientes inativos (excipientes) na preparação de medicamentos (50). Por outro lado, em cosmética, são frequentemente utilizados em produtos como sabonetes, cremes e champôs, ou ingredientes como emulsionantes e lipossomas (50). Em produtos cosméticos, os MUFAs e PUFAs têm funções emolientes, suavizantes, hidratantes, protetoras e são promotores de elasticidade (67,68). Os FAs $n-3$, $n-6$ e ômega 9 ($n-9$) têm também um papel relevante na cicatrização de feridas cutâneas. A cicatrização de feridas envolve uma sequência de eventos moleculares e celulares, que inclui inflamação, migração celular, angiogênese, síntese de matriz extracelular e re-epitelização (69). Para controlar estes diferentes processos são necessários vários mediadores biológicos. O estabelecimento de uma reação inflamatória envolvendo a migração celular e a liberação de mediadores do ácido araquidônico (AA, 20:4) são etapas cruciais no início do processo de cicatrização de feridas e na reparação final do tecido. Os ácidos gordos insaturados (UFAs, do inglês, *unsaturated fatty acids*), como o 18:2 $n-6$ e o 18:3 $n-3$, são importantes precursores do AA e podem modificar a resposta inflamatória e, conseqüentemente, os processos de cicatrização (70). O 18:2 $n-6$ mostrou-se relevante na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos (70). Por outro lado, o 18:1 $n-9$ leva a uma melhor cicatrização da ferida e desempenha um papel importante no tratamento de feridas abertas na pele, como queimaduras (70).

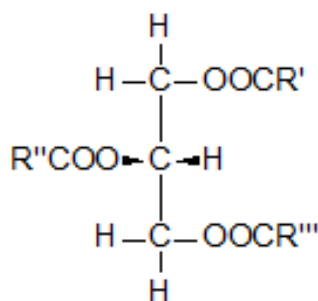
Embora a maioria dos FAs nos óleos de sementes de frutos esteja esterificada em outros lípidos (TAGs e lípidos polares), uma pequena percentagem encontra-se sob a forma não esterificada (livre). A percentagem de FAs livres para algumas sementes de frutos está representada na Tabela 4.

Tabela 4. Percentagem de ácidos gordos livres em óleos de sementes de frutos

	Ameixa	Azeitona	Cereja	Alperce	Framboesa	Goiaba	Kiwi	Maracujá	Melão	Nectarina	Pêssego	Tamareira
Referência	(27)	(71)	(27)	(27)	(72)	(37)	(37)	(73)	(74)	(27)	(27)	(75)
%	0,90	8,00	0,38	0,87	2,70	0,23	0,44	1,18	0,52	0,50	0,44	0,59

A maioria dos óleos de sementes de frutos tem uma elevada percentagem de UFAs (cerca de 70-100%) (Tabela 5). No que se refere às percentagens de MUFAs e PUFAs, os óleos com maior teor são o óleo de sementes de papaia (67,50-77,60%) (46,47) e o óleo de sementes de goiaba (71,30-90,00%) (37), respetivamente. Finalmente, as maiores percentagens de FAs *n*-3 e *n*-6 foram observadas, respetivamente, no óleo de sementes de kiwi (61,20-62,90%) (37) e no óleo de sementes de goiaba (70,80-89,50%) (37). O óleo de sementes de azeitona tem alto conteúdo em 18:1 (59,07-68,02%), seguido de 18:2 (16,55-24,24%) e 16:0 (8,82-16,04%). Além disso, o óleo de sementes de azeitona possui um alto teor em MUFAs (59,34-69,26%), é uma boa fonte de PUFAs *n*-6 (17%), e também contém FAs *n*-3 (0,13%) em pequena quantidade (76), permitindo que seja utilizado como um ingrediente promissor na indústria alimentar e cosmética (31,76,77).

Os lípidos que constituem as sementes de frutos são maioritariamente TAGs. Os TAGs consistem num triéster que resulta da combinação de uma molécula de glicerol esterificada com três FAs (Figura 4). Os TAGs são os principais lípidos de armazenamento em sementes de plantas (78). São de grande valor nutricional e nutracêutico e, portanto, uma fonte comum em óleos alimentares para consumo humano e fins industriais (78). O perfil de TAGs dos óleos vegetais tem sido considerado como uma medida da sua qualidade e pureza (79).

**Figura 4.** Estrutura geral de um triacilglicerol (projeção de Fischer). Fonte: referência (80).

A estrutura dos TAGs determina as propriedades físicas dos óleos através da distribuição dos FAs no esqueleto de glicerol (posição *sn-1*, *sn-2* e *sn-3*) (52) e são os TAGs que transportam os FAs. Tanto a estrutura dos TAGs como o tipo de FAs esterificados no glicerol que os compõem, ou seja, o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a distribuição na molécula (*sn-1*, *sn-2* e *sn-3*), têm um papel importante. Estes fatores afetam o metabolismo, digestão e absorção dos TAGs no organismo (81). A composição em UFAs dos TAGs é um dos principais determinantes no estudo da oxidação de óleos vegetais (82).

Tabela 5. Perfil de ácidos gordos (g/100 g) de óleos de sementes de frutos

Ácido gordo	Azeitona	Maçã (cv. <i>red Fuji</i>)	Pêra (cv. <i>Dangshan Suli</i>)	Papaia	Abóbora	Uva	Melancia	Laranja	Alperce	Marmelo	Amendoim
Referência	(31,76,77)	(39-42)	(39)	(46,47)	(34,83)	(84,85)	(44,84)	(38)	(3)	(3)	(3)
6:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8:0	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
9:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:0	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
12:0	-	-	-	0,28	0,01	-	-	-	-	-	-
13:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14:0	0,12	-	-	0,10-0,72	0,11	-	-	-	-	-	-
14:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0	8,82-16,04	5,61-10,50	6,39	12,80-19,70	10,40-12,60	5,80-14,20	11,30-11,36	25,20	4,90-6,40	6,80	9,50
16:1	0,13-0,54	0,06	0,12	0,20-2,10	0,15	-	-	-	0,60-1,00	0,10-0,20	0,10
17:0	0,10-0,12	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-
17:1	0,09-0,11	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-
18:0	2,47-6,81	1,47-4,30	1,75	4,40-6,68	3,80-7,30	8,60	7,04-10,20	4,20	1,00-1,10	1,50	3,20
18:1	59,07-68,02	4,10-26,47	20,28	66,74-76,80	21,00-49,10	13,70-31,90	13,25-18,10	26,10	1,40-68,30	0,60-33,80	52,50
18:2n-6	16,55-24,24	43,03-51,20	56,80	3,00-3,63	30,80-65,80	50,10-77,80	59,60-68,30	37,80	23,10-31,40	55,40	28,30
18:3n-3	0,10-0,42	0,60-5,60	0,32	0,10-0,20	0,18	5,00	0,40	6,70	0,10-0,20	0,20	0,10
18:4	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10	0,30	1,00
19:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:0	0,33-0,59	1,31	1,25	0,36-0,41	0,39	0,15	-	-	-	-	-
20:1	0,14-0,59	0,39	0,28	0,30-0,46	0,11	0,12-0,59	-	-	0,10	0,60	1,50

20:2	-	0,04	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-
22:0	0,11-0,40	0,27	0,24	1,34	0,12	-	-	-	-	-	-	-
22:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24:0	-	0,09	0,11	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-
SFA	11,95-24,08	8,74-14,80	9,73	18,60-29,00	14,99-20,69	14,15-22,95	18,40-21,50	29,40	5,90-7,50	8,30	12,70	
UFA	76,08-93,92	70,60-89,33	77,85	70,90-81,56	52,28-115,38	69,04-115,41	78,40-81,55	70,60	25,40-101,10	57,20-90,90	83,50	
MUFA	59,43-69,26	4,55-26,92	20,68	67,50-77,60	21,30-49,40	13,82-32,49	13,25-18,10	26,10	2,10-69,40	1,30-34,60	54,10	
PUFA	16,65-24,66	43,67-56,84	57,17	2,10-6,30	30,98-65,98	55,22-82,92	60,00-68,70	44,50	23,30-31,70	55,90	29,40	
MUFA/PUFA	2,81-3,57	0,10-0,47	0,36	12,32-32,14	0,69-0,75	0,25-0,39	0,22-0,26	0,59	0,09-2,19	0,02-0,62	1,84	
MUFA/SFA	0,74-4,97	0,52-1,82	2,13	2,68-3,63	1,42-2,39	0,98-1,42	0,72-0,84	0,89	0,36-9,25	0,16-4,17	4,26	

Tabela 5. Perfil de ácidos gordos (g/100 g) de óleos de sementes de frutos (cont.)

Ácido gordo	Maracujá	Abacate	Cereja	Nectarina	Pêssego	Ameixa	Amora	Sabugueiro	Figo-da-Índia	Mirtilo	Romã	Manga	Kiwi	Goiaba
Referência	(73)	(32)	(27)	(27)	(27)	(27)	(35)	(35)	(36)	(45)	(48)	(43)	(37)	(37)
6:0	-	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7:0	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8:0	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9:0	-	0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12:0	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02- 3,08	-	-	-
13:0	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14:0	-	0,54	-	-	-	-	-	0,04	0,13-0,19	-	0,03- 0,04	0,70	-	0,20
14:1	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15:0	-	2,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15:1	-	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0	9,73	20,85	7,60	6,10	8,10	6,30	2,45	4,07	13,21- 15,60	5,30- 6,10	18,16- 22,63	6,48- 10,50	8,10	3,60- 9,90

16:1	0,11	1,79	0,30	0,50	0,40	0,50	0,07	0,05	1,44-1,85	-	0,22-2,70	21,90	0,20	0,20
17:0	-	1,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20
17:1	-	0,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0	2,58	1,19	2,30	-	-	1,40	0,94	0,64	3,31-4,79	1,40-1,60	8,10-10,42	2,20-38,90	0,20-4,00	1,40-8,00
18:1	13,83	17,41	52,90	68,30	58,50	62,00	8,33	4,12	21,05-25,60	23,20-23,40	24,76-31,26	42,60-59,90	0,10-17,30	0,10-8,70
18:2n-6	73,14	38,89	35,00	26,80	32,80	29,60	15,34	11,73	52,25-57,76	33,60-33,70	31,49-38,61	1,90-14,00	13,90-20,60	70,80-89,50
18:3n-3	0,41	6,58	-	-	-	-	4,22	9,81	0,29-0,97	35,50-36,30	0,61-9,94	2,37-5,30	61,20-62,90	0,50
18:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19:0	-	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:0	0,10	0,04	1,40	0,30	0,30	0,30	0,04	0,03	0,42-0,66	-	1,06-2,76	-	0,30	0,80
20:1	0,10	0,45	-	-	-	-	0,03	0,04	-	-	-	-	0,30	0,20
20:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:3	-	1,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22:0	-	1,11	-	-	-	-	0,04	0,03	0,21-0,30	-	0,23-0,85	-	-	-
22:1	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24:0	-	1,69	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14-0,77	-	-	-
SFA	12,41	32,50	11,30	6,40	8,40	8,00	3,47	4,81	17,28-21,54	6,70-7,70	27,96-43,25	9,38-50,10	8,60-12,40	6,20-19,10

UFA	87,59	67,44	88,20	93,60	91,70	92,10	27,99	25,75	75,03-86,18	92,30-93,40	57,08-82,51	68,77-101,10	75,70-101,30	71,80-99,10
MUFA	14,04	20,71	53,20	68,80	58,90	62,50	8,43	4,21	22,49-27,45	23,20-23,40	24,98-33,96	64,50-81,80	0,60-17,80	0,50-9,10
PUFA	73,55	46,73	35,00	26,80	32,80	26,90	19,56	21,54	52,54-58,73	69,10-70,00	32,10-48,55	4,27-19,30	75,10-83,50	71,30-90,00
MUFA/PUFA	0,19	0,44	1,52	2,57	1,80	2,32	0,43	0,20	0,43-0,46	0,33-0,34	0,70-0,78	4,24-15,11	0,01-0,21	0,01-0,10
MUFA/SFA	1,13	0,64	4,71	10,75	7,01	7,81	2,43	0,88	1,30-1,27	3,04-3,46	0,79-0,89	1,63-6,88	0,07-1,44	0,08-0,48

Abreviaturas: 6:0, ácido caprónico; 7:0, ácido enântico; 8:0, ácido caprílico; 9:0, ácido pelargónico; 10:0, ácido cáprico; 12:0, ácido láurico; 13:0, ácido tridecanónico; 14:0, ácido mirístico; 14:1, ácido miristoleico; 15:0, ácido pentadecanónico; 15:1, ácido pentadecenónico; 16:0, ácido palmítico; 16:1, ácido palmitoleico; 17:0, ácido heptadecanónico; 17:1, ácido heptadecenónico; 18:0, ácido esteárico; 18:1, ácido oleico; 18:2, ácido linoleico; 18:3, ácido linolénico; 18:4, ácido estearidónico; 19:0, ácido nonadecanónico; 20:0, ácido araquídico; 20:1, ácido eicosenónico; 20:2, ácido eicosadienónico; 20:3, ácido eicosatrienónico; 20:4, ácido araquidónico; 22:0, ácido beénico; 22:1, ácido erúxico; 24:0, ácido tetracosanónico; *n*-6, ácido gordo ómega-6; *n*-3, ácido gordo ómega-3; SFA, ácido gordo saturado; UFA, ácido gordo insaturado; MUFA, ácido gordo monoinsaturado; PUFA, ácido gordo polinsaturado.

Nas sementes de azeitona, esta classe de compostos corresponde a cerca de 80% (71) a 97% (77) do conteúdo lipídico. Já nas sementes de papaia, tamareira, maçã, e uva, correspondem a 65% a 75% (42,86), 70% a 80% (75), 60% a 90% (88), e 80% a 100% (89), respetivamente. A Tabela 6 mostra o perfil de TAGs do óleo de diferentes sementes de frutos. As principais espécies moleculares que os constituem são TAG(52:4), TAG(54:3), TAG(54:4), TAG(54:5), TAG(54:6), TAG(52:2), TAG(42:0), TAG(46:1) e TAG(54:2), compostas principalmente por 18:1, 18:2, 16:0 e 18:0. Os óleos de sementes de azeitona e tamareira apresentam em comum os TAGs 50:2, 52:2, 54:6 e 54:5, compostos principalmente por 16:0, 18:1 e 18:2 (71,76 e 75, respetivamente). No óleo de sementes de azeitona, os TAGs mais abundantes são TAG(54:3) (34,85-39,98%), TAG(54:4) (20,27-23,24%) e TAG(52:2) (11,98-16,89%) (71,76), e recentemente foram identificadas outras espécies moleculares diferentes de TAGs em menor quantidade (76).

Tabela 6. Perfil de triacilgliceróis dos óleos de sementes de frutos

TAG	C:N	Azeitona (<i>Olea europaea</i>)	Papaia	Tamareira das Canárias (<i>Phoenix canariensis</i>)	Maçã	Uva
Referência		(71,76)	(86)	(75)	(88)	(89)
LaLaLa	36:0	-	-	2,11	-	-
LaLaM	38:0	-	-	4,64	-	-
LaMM + LaLaP	40:0	-	-	18,90	-	-
LaLaO	42:1	-	-	1,04	-	-
LaMP + MMM	42:0	-	-	15,31	-	-
LaMO	44:1	-	-	4,98	-	-
LaPP	44:0	-	-	0,34	-	-
LaPO	46:1	-	-	11,33	-	-
MPP	46:0	-	-	0,33	-	-
PoPoLn	50:5	-	-	-	-	0,10-0,90
PoPoL, PoPLn	50:4	-	-	-	-	0,20-0,50
PPLn, PPoL	50:3	-	-	-	-	0,10-0,30
PPL, PPO, OOM, PoPoS	50:2	0,20	-	4,63	-	0,30-0,90
PPO, PPOs	50:1	0,49-2,57	5,10-6,15	2,05	0,17-0,31	0,10-1,00
PPS	50:0	-	-	-	-	-
C_{17:1}PoLn	51:5	-	-	-	-	0,20-0,80
C_{17:1}PoL	51:4	-	-	-	-	0,10-0,50
C_{17:0}PoLn						
C_{17:1}PLn						
PLLn, PoOLn, PoLL	52:5	-	-	-	-	0,40-0,50

Tabela 6. (Continuação)

PLL, PoOL, POLn, PoSLn	52:4	0,73-2,26	-	-	39,32- 41,17	19,70-24,30
POL, PoOO, PSLn, PoSL	52:3	5,25-7,93	2,30-2,80	-	-	3,30-9,30
POO, PSL, PoSO, PoPoA	52:2	11,98-16,89	-	3,81	0,51-1,76	0,50-3,10
PSO, PPOA, PPG, PoSS	52:1	1,33	3,15-3,80	1,06	-	0,10-0,20
PPA, PSS	52:0	-	-	-	-	0,10-1,10
OLnLn, LLLn	54:7	-	-	-	-	0,40-0,80
LLL, OLLn, SLnLn	54:6	0,66-1,92	-	0,67	17,80- 27,12	34,60-41,80
OLL, OOLn, SLLn,	54:5	6,18-7,85	0,30	1,29	4,49-7,90	13,80-17,60
OOL, SLL, SOLn	54:4	20,27-23,24	3,70-4,40	2,44	5,60-7,29	9,10-11,70
OOO, SOL, SSLn	54:3	34,85-39,98	41,30- 44,60	3,77	0,50-24,71	1,30-4,30
SOO, SSL	54:2	5,46-6,61	9,70-11,00	1,08	-	0,20-0,60
SSO, POA	54:1	2,81	-	-	-	-
LLnA, LLG	56:5	-	-	-	-	0,20-0,80
OLG, OLnA, LLA	56:4	-	-	-	-	0,30-1,70
OOG, OLA, SLG, SLnA	56:3	0,24	-	-	-	0,10-0,40
OOA, SLA, PLB, SOG	56:2	0,23	-	-	-	0,10-0,40
POB, SOA, SSG	56:1	0,09	-	-	-	0,10
LLB, LGG, LnAG	58:4	-	-	-	-	0,10
OGG, LAG, LnAA	58:3	-	-	-	-	0,10
SLB, SGG, OOB, LAA	58:2	-	-	-	-	0,10

Abreviaturas: La, ácido láurico, 12:0; M, ácido mirístico, 14:0; P, ácido palmítico, 16:0; Po, ácido palmitoleico, 16:1; C_{17:0}, ácido heptadecanóico, 17:0; C_{17:1}, ácido heptadecenóico, 17:1; S, ácido esteárico, 18:0; O, ácido oleico, 18:1; L, ácido linoleico, 18:2; Ln, ácido linolénico, 18:3; A, ácido araquídico, 20:0; G, ácido gadoleico, 20:1; B, ácido beénico, 22:0; TAG, triacilglicerol; C:N, número de carbonos:número de ligações duplas.

1.2.1.2. *Lípidos minoritários: lípidos polares*

Os lípidos minoritários dos óleos de sementes de frutos incluem várias classes de compostos, entre os quais os esteróis e os lípidos polares. Ambos os grupos possuem efeitos benéficos para a saúde e nutrição humanas, tendo diversas aplicações industriais quando recuperados de subprodutos da agroindústria, como sementes e óleos de sementes.

Os esteróis vegetais são componentes essenciais das membranas de todos os organismos eucarióticos (90). Os esteróis são álcoois esteróides. Assemelham-se ao colesterol, esterol dos animais, tanto na sua estrutura química como na sua função biológica. Formam um grupo de triterpenos (90). Os esteróis são compostos por um anel de ciclopenta[α]fenantreno tetracíclico e uma cadeia lateral longa e flexível no átomo de carbono C-17 (90). Os esteróis vegetais mais comuns são o sitosterol, o estigmasterol e o campesterol (4-desmetil esteróis) (90). Os esteróis regulam a fluidez das membranas e participam na adaptação das membranas às variações de temperatura (91). O grupo hidroxilo livre em esteróis livres é um fator importante que permite a sua interação com PLs e proteínas em membranas. Além destas funções, os esteróis participam no controlo dos processos metabólicos associados à membrana, o que envolve a ação de alguns esteróis específicos. Também desempenham um papel importante nos processos celulares e de desenvolvimento em plantas como precursores de brassinosteróides. No entanto, também atuam como substratos para uma ampla gama variedade de metabolitos secundários (90).

Os lípidos polares têm sido bastante menos estudados do que os esteróis e, por isso, serão alvo de estudo neste trabalho. Os lípidos polares compreendem uma ampla gama de classes de moléculas. Eles serão divididos em classes ou grupos tais como PLs, GLs, esfingolípido e glucósidos.

Devido à sua estrutura química, os PLs são classificados como lípidos complexos (92). Os PLs são compostos por uma molécula de glicerol, FAs, e um grupo fosfato hidrofílico que está, na maioria das classes de PLs, ligado a um grupo que corresponde à cabeça polar (92), geralmente, uma base orgânica ou um composto poli-hidroxi. O fosfato está quase sempre ligado à posição *sn*-3 da molécula de glicerol (93). A parte hidrofóbica desses compostos consiste em duas cadeias de FAs (Figura 5) ou, uma cadeia, no caso das formas liso (94).

Os PLs são os principais componentes lipídicos das membranas celulares não fotossintéticas (95) e são importantes moléculas reguladoras e sinalizadoras (96). Os PLs estão envolvidos na sinalização celular, uma vez que são componentes integrais das membranas celulares e, portanto, são indispensáveis para a comunicação e interação entre as células (97–99). Eles desempenham um papel importante no armazenamento e empacotamento dos TAGs nos óleos de sementes, participando na formação de gotículas lipídicas em associação com as proteínas oleosinas (100).

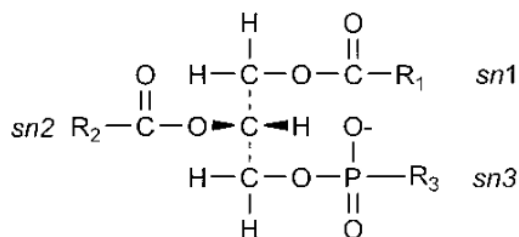


Figura 5. Estrutura geral de um fosfolípido (93).

Os PLs provenientes de fontes alimentares têm sido associados a um efeito positivo na saúde (101), uma vez que são fontes de PUFAs, em contraste com os TAGs, ricos em MUFAs e SFAs (101). Todos os alimentos vegetais contêm alguns PLs como parte das suas membranas celulares e a cabeça polar e a composição em FAs variam (102). Vários estudos mostraram que, em geral, os PLs podem ter um efeito nutricional positivo na saúde humana (102), como a redução do risco da doença cardiovascular (63,64,65), a redução dos níveis de colesterol no sangue (103), e o aumento da função cerebral (104). Os PLs também são considerados potenciais antioxidantes naturais dos óleos alimentares (105). Vários estudos têm relatado as propriedades antioxidantes sinérgicas dos PLs, incluindo a fosfatidilcolina (PC, do inglês, *phosphatidylcholine*), a fosfatidiletanolamina (PE, do inglês, *phosphatidylethanolamine*) e a fosfatidilserina (PS, do inglês, *phosphatidylserine*), com fenóis nestas matrizes (106–109).

Os PLs são o principal componente das lecitinas, que são um subproduto isolado durante a extração de óleos alimentares compostos por uma mistura de gliceroPLs, incluindo a PC, a PE, o fosfatidilinositol (PI, do inglês, *phosphatidylinositol*), PS e o ácido fosfático (PA, do inglês, *phosphatidic acid*) (110). As lecitinas são ingredientes importantes de muitas fórmulas industriais de alimentos (111).

Nas sementes de frutos, as classes de PLs encontradas mais comumente são PC, PE e PA. As suas estruturas químicas estão representadas na Figura 6. A quantidade

estimada de PLs é de 7,4 a 10,9% em sementes de abacate (112), 3,5% em sementes de framboesa (72) e cerca de 2,1% em sementes de melão (113). As sementes de abacate contêm 30,7-31,9% de PE, 28,9-31,7% de PC, 14,5-17,6% de PA, 10,5-13,4% de fosfatidilglicerol (PG, do inglês, *phosphatidylglycerol*), e 3,6-4,2% de PI (112). Nestas sementes, aproximadamente 45% das cadeias acil dos PLs continham 18:1 *n*-9 (112). Em sementes de framboesa, a análise dos FAs dos PLs mostrou que os FAs dominantes são o 18:2 (63,55%), o 18:1 (19,24%), o 16:0 (10,92%) e o 18:3 (6,29%) (72). Em sementes de melão, as classes PC e PE correspondem a 26,0% e 29,3%, respectivamente. Outras classes como PA, PS, PG, lisoPC e lisoPE estão presentes em pequenas quantidades ($\leq 10,2\%$ do total) (113). A composição em FAs de PLs individuais mostrou que os PAs, as PSs, as PCs, as lisoPCs e as lisoPEs continham quantidades elevadas de 16:0 (32,3%, 56,8%, 58,7% e 45,7%, respectivamente). As PEs também continham uma elevada quantidade de 18:2 (52,0%) e os PGs continham 37,7% de 18:1 (113). No óleo de sementes de azeitona, a quantidade de PLs é de cerca de 0,1-0,9% (94,114). Foram identificados nestas sementes cerca de 88% de PA, 6% de PI, 4,4% de PC, 1,2% de PG, e 0,2% de lisoPA (115).

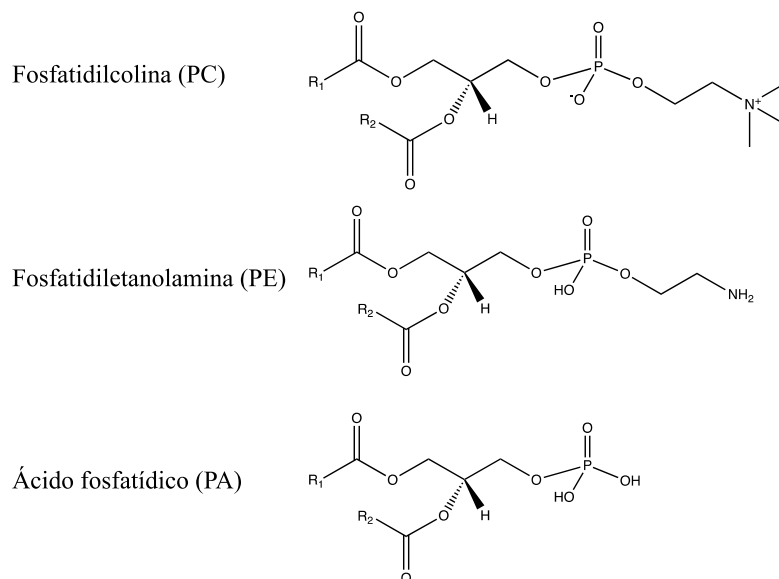


Figura 6. Classes de fosfolípidos comumente presentes em sementes de frutos.

A análise de PLs nas sementes de frutos tem ganho relevância, uma vez que estes compostos têm sido considerados ingredientes promissores para serem recuperados dos subprodutos da indústria. No caso específico da azeitona, os PLs têm sido sugeridos para diversos usos biotecnológicos, como para formulações agrícolas e

de ração para peixes e gado, ou nas indústrias farmacêutica, cosmética e de sabão (revisto por (13)). No caso da indústria agroalimentar, poderão ser utilizados para a produção de lecitina. Por outro lado, sendo PLs derivados de alimentos, têm várias aplicações biomédicas, como, por exemplo, emulsionantes em produtos farmacêuticos e na preparação de lipossomas para cosméticos e administração de medicamentos (13).

Os GLs são componentes de membranas celulares constituídos por uma cauda lipídica hidrofóbica e um ou mais grupos de açúcares hidrofílicos ligados por uma ligação glicosídica (116). Como os PLs, os GLs também incluem uma ampla variedade de estruturas. Estas estruturas consistem em acilgliceróis (no caso de glicosilglicéridos e sulfolípidos) unidos a uma unidade de carboidrato por uma ligação glicosídica na posição *sn-3*.

Os GLs são encontrados no folheto externo das membranas celulares, onde desempenham não apenas um papel estrutural para manter a estabilidade da membrana, mas também facilitam a comunicação célula-célula, atuando como recetores, âncoras para proteínas e reguladores de transdução de sinal. A membrana tilacóide dos cloroplastos das plantas contém GLs (117), tais como monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG) e sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) (118) (Figura 7). Estes compostos têm sido associados a ações benéficas tais como funções potencialmente anti-tumorais, incluindo a inibição da polimerase de ADN e a supressão da proliferação de células tumorais de adenocarcinoma do cólon (119). Além disso, verificou-se que o MGDG apresenta maior atividade anti-tumoral e anti-inflamatória do que os outros dois GLs (120). Quando ingeridos, os GLs são macromoléculas usadas para uma série de funções no organismo (116). São marcadores de reconhecimento celular e também fornecem energia (116). Para uso externo, os GLs são agentes ativos de superfície não-iônicos de ocorrência natural que têm uma ampla variedade de aplicações nas indústrias alimentares, cosmética, farmacêutica e agrícola (121). Na indústria farmacêutica, os GLs têm sido usados como estabilizadores de ingredientes mutuamente incompatíveis em emulsões (121). Adicionalmente, a biocompatibilidade dos derivados de GLs também pode ser utilizada para sintetizar niossomas que são semelhantes aos lipossomas naturais do conjunto de PLs (121). Estas microesferas glicolipídicas são altamente versáteis e têm sido utilizadas no encapsulamento, transporte e libertação controlada de aromas, produtos alimentares, produtos agrícolas e de aquacultura, produtos biológicos e farmacêuticos humanos, cosméticos e outros produtos de higiene pessoal (121).

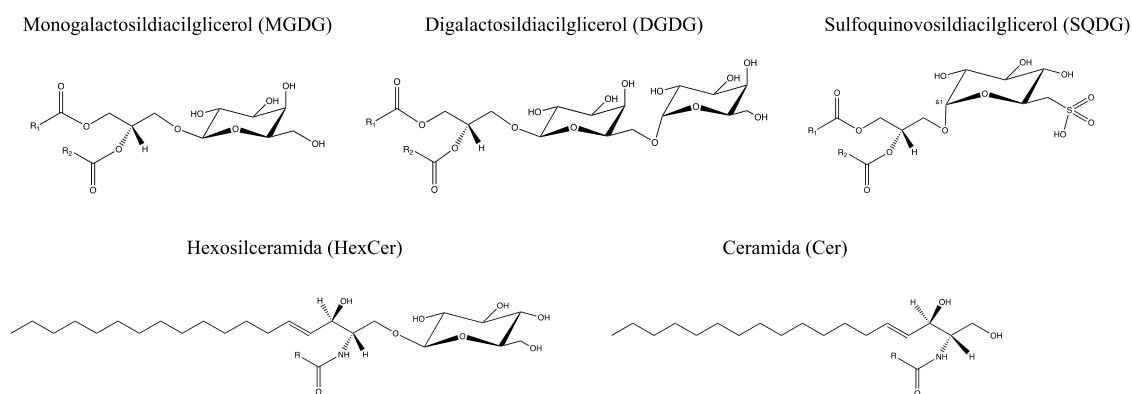


Figura 7. Classes de glicolípidos e esfingolípidos comumente presentes em sementes de frutos.

No caso dos esfingolípidos, a ligação de um FA ao grupo amina da esfingosina ou outro amino álcool relacionado origina uma ceramida. No entanto, a ligação da glucose ou da galactose pela ligação *O*-éster ao álcool primário da porção esfingosil dá origem a um glicosfingolípido, também denominado cerebrósido (122). Os esfingolípidos, nomeadamente as ceramidas e as hexosilceramidas (HexCer) (Figura 7), são importantes constituintes da membrana plasmática em células de mamíferos. São componentes fundamentais da estrutura lamelar que medeiam a função da permeabilidade epidérmica e a homeostase da pele (123–125). Os esfingolípidos são encontrados em muitos alimentos e estima-se que o seu consumo diário seja de 0,3 a 0,4 g/dia (126). A digestão dos esfingolípidos liberta as bases esfingóides das ceramidas (127–130), que são as moléculas bioativas que inibem o crescimento de células cancerígenas e induzem a diferenciação e apoptose *in vitro*. Portanto, podem servir como componentes dietéticos bioativos para diminuir a carcinogénese (131). A glucosilceramida (GluCer) é um dos principais esfingolípidos do tecido vegetal. Alguns estudos evidenciam que a GluCer obtida a partir de vegetais da dieta ajuda a melhorar e manter a função da barreira da epiderme (132).

Os esteróis glicosilados acilados (ASGs, do inglês, *acylated sterol glucosides*) são glucósidos encontrados numa variedade de plantas em diferentes níveis e em diferentes composições (133). Os ASGs resultam da acilação de um FA de cadeia longa na posição 6 da porção de glucose (134) (Figura 8) e são encontrados na membrana plasmática de plantas (135). Estudos recentes demonstraram que os ASGs em ratinhos reduzem a absorção do colesterol (45%) (136). Além disso, foi demonstrado que o grupo acilo foi clivado do ASG, dando origem a um SG, mas a ligação glicosídica permaneceu intacta no trato digestivo. Assim, estes estudos evidenciam que os ASGs

também são componentes dietéticos eficazes na redução do colesterol e que a sua ingestão pode ajudar, em parte, na redução do risco de doenças cardiovasculares (133). O conteúdo de ASGs, bem como o perfil de esteroide encontrado na forma glicosilada, é fortemente dependente do tipo de planta em estudo (133). Por exemplo, a percentagem de ASGs em sementes de girassol é de 2,6%, em sementes de mostarda é de 3,1%, e em sementes de abóbora é de 6,1% (133).

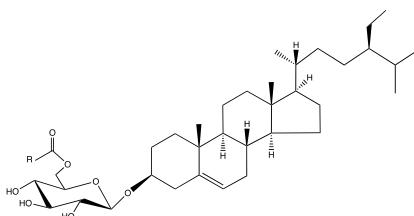


Figura 8. Estrutura química de um esteroide glicosilado acilado (ASG).

A quantidade de GLs, glucósidos e cerebrosídeos estimada em sementes de frutos foi de 12,0-13,2% em sementes de abacate (112) e 6,4% em sementes de melão (113). Foram identificadas cinco classes destes compostos nas sementes de abacate: MGDGs (56,3-57,7%), ASGs (17,5-18,6%), glucósidos de esteroide (SGs, do inglês, *sterol glucoside*, 10,1-10,8%), cerebrosídeos (9,8-10,7%) e DGDGs (1,7-2,0%) (112). A análise dos FAs nos GLs das sementes de abacate mostrou que os FAs dominantes são o 18:2n-6 (35,3-38,2%), o 18:1n-9 (24,0-22,4%) e o 16:0 (17,7-19,0%) (112). As sementes de melão revelaram quatro classes de glicolípido: DGDGs (26,1%), MGDGs (21,7%), acil-monogalactosilmonoacilglicerol (acil-MGMGs, 44,3%) e ASGs (7,9%) (113). A composição em FAs nas diferentes classes de GLs mostrou que os ASGs continham 28,2% de 18:1, os MGDG continham 35,9% de 16:0 e os DGDG e acil-MGMG continham 42,0% e 41,4% de 18:2, respetivamente (113). As azeitonas possuem glicolípido (DGDG) na polpa numa concentração de 280 mg Kg⁻¹ (137). Recentemente, foram identificados MGDGs, DGDGs e a sua forma liso (digalactosilmonoacilglicerol, DGMG) na polpa da azeitona, representando 25,44% dos lípidos polares (138). No entanto, para a semente de azeitona, a quantidade e o perfil de GLs ainda não foram reportados.

Assim, a caracterização dos compostos lipídicos bioativos nas sementes de frutos e a avaliação das suas potenciais propriedades biológicas são de particular importância para a valorização dessas sementes como fonte de componentes benéficos para a saúde humana (35).

1.3. Metodologias de análise de lípidos em óleos de sementes de frutos

Para a análise da composição de lípidos de sementes e de óleos de sementes, tem emergido um ramo recente das ciências “ômicas”, a lipidômica. As metodologias analíticas utilizadas em lipidômica para a caracterização das diferentes classes de lípidos incluem várias etapas que começam com a extração de lípidos, seguida de fracionamento, análise, identificação e quantificação.

A extração lipídica é normalmente realizada por extração líquido/líquido (LLE, do inglês, *liquid/liquid extraction*) ou/e extração em fase sólida (SPE, do inglês, *solid-phase extraction*). Os dois métodos principais usados para a LLE em lipidômica são o método de Folch (clorofórmio/metanol (2:1), por volume)) e o método de Bligh & Dyer (clorofórmio/metanol/água (1:2:0,8), por volume)) (139). Neste último método, ainda há uma nova adição de clorofórmio. Em ambos os métodos, é adicionada água para induzir a separação de fases, a fase superior (que contém água) e a fase inferior (que contém clorofórmio). Os lípidos são recuperados da fase inferior (140). Além destes métodos, a extração lipídica pode ser feita através do método Soxhlet, que consiste num fluxo líquido (transportador) contendo os componentes a serem recuperados (soluto), alimentando-o num extrator, onde entra em contacto com o solvente. A transferência de massa ocorre entre as gotículas (fase dispersa) e o líquido circundante (fase contínua) (141). Para que ocorra a separação, os dois líquidos devem exibir diferentes densidades (141).

A extração lipídica a partir de sementes de frutos foi realizada através do método de Soxhlet em sementes de azeitona (28,71,77), maçã (41,42), papaia (86), laranja (38), melancia (44), abóbora (34), melão (143), maracujá (73), tâmara (75), cereja (27), nectarina (27), pêssego (27), ameixa (27), amora (35), sabugueiro (35), figo-da-Índia (36) e romã (48). No entanto, a extração lipídica para algumas sementes de frutos também foi realizada através do método de Folch, como é o caso das sementes de azeitona (76), alperce (27), cereja (27), nectarina (27), pêssego (27) e ameixa (27).

O fracionamento de lípidos a partir de um extrato lipídico total pode ser realizado utilizando SPE, que é baseada na diferença de afinidade entre o(s) analito(s) de interesse numa matriz líquida adsorvida a uma fase sólida (adsorvente), permitindo a separação do(s) analito(s) de interesse dos outros analitos (interferentes) (143). Esta técnica consiste numa coluna com sílica empacotada que é primeiramente condicionada com

solvente, e, depois, a solução de carregamento, contendo o analito, passa através da fase sólida, sendo o(s) analito(s) e, eventualmente, algumas impurezas, retidos na fase sólida (143). Em seguida, a fase sólida é submetida a um passo de lavagem, para remover as impurezas ou para remover compostos que não se pretende recuperar e, finalmente, o(s) analito(s) é(são) recolhido(s) durante um ou mais passos de eluição (143). Podem ser utilizados vários eluentes para eluir os diferentes analitos da matriz, de acordo com a sua polaridade. As colunas mais utilizadas para separar frações de TAGs, esteróis, e lípidos polares são as de troca iónica como as de sílica com grupos aminopropilo (NH₂) ou as de fase normal como as de sílica não funcionalizada (140). A técnica de SPE foi utilizada no fracionamento dos óleos de sementes de azeitona (76) e de framboesa (72).

O fracionamento lipídico pode ser também efetuado através de cromatografia em camada fina (TLC, do inglês, *thin-layer chromatography*) (144). A TLC é uma técnica convencional, normalmente usada em lipidómica para separar classes de lípidos, monitorizar a eficiência de uma extração, determinando a pureza do extrato após uma etapa prévia de extração ou separação, e requer pequenas quantidades (µg) do composto. A TLC é realizada através de uma placa de vidro, metal ou plástico rígido revestida por uma camada fina e uniforme de um gel de sílica ou alumina (145). O gel de sílica (ou alumina) é a fase estacionária, e as bandas (spots) de lípidos são detetadas após a pulverização da placa de TLC com diferentes agentes reveladores (iodo, primulina, entre outros) (145). Quanto à fase móvel, utiliza-se um solvente ou mistura de solventes (145). A fase móvel flui através da fase estacionária e transporta os componentes da mistura com esta fase (145). Em lipidómica, normalmente utilizam-se diferentes sistemas de solventes para separar as classes de lípidos por TLC. Numa TLC unidimensional é possível separar classes de lípidos (acilgliceróis) de um óleo utilizando um sistema de solventes composto por hexano/éter dietílico/ácido acético ou fórmico (80:20:1, por volume, ou ligeiras variações nas proporções destes eluentes). Para a separação de diferentes classes de lípidos polares, recorre-se a uma mistura de solventes composta por clorofórmio/etanol/água/trietilamina (35:30:7:35, por volume). O fracionamento lipídico através de TLC foi realizado no óleo de sementes de azeitona (71,146).

Após o fracionamento do extrato lipídico em grupos lipídicos, os diferentes lípidos poderão ser analisados com base na sua polaridade (e.g., lípidos apolares, lípidos medianamente polares, lípidos polares) ou em classes lipídicas (e.g., classes de lípidos

polares). Noutros casos, a totalidade do extrato é analisada sem recurso a uma separação prévia, como a análise dos FAs totais.

A análise dos FAs é, geralmente, realizada por cromatografia de fase gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (GC-MS, do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry*) ou a um detetor de ionização de chama (GC-FID, do inglês, *gas chromatography-flame ionization detection*). A GC-MS é uma combinação de duas técnicas instrumentais avançadas para a análise de compostos orgânicos. É a técnica mais eficaz para a análise de compostos orgânicos voláteis em matrizes complexas numa ampla gama de concentrações. Consiste num cromatógrafo de fase gasosa, onde a amostra é volatilizada (fase gasosa), permitindo a separação dos vários componentes usando uma coluna capilar com uma fase estacionária (fase sólida) (147). Ao sair da coluna de GC, os componentes são ionizados num espectrómetro de massa com uma fonte de impacto eletrónico (147). Finalmente, o último passo envolve a deteção e análise de iões, com picos compostos aparecendo em função da razão massa/carga (m/z) (147). Como o método de GC permite a análise de moléculas pequenas e voláteis (147) e os FAs não são moléculas voláteis, as amostras (extratos lipídicos totais ou frações lipídicas) são submetidas, geralmente, a técnicas de derivatização usando hidrólise ácida ou alcalina, de modo a que os FAs possam ser analisados como ésteres metílicos de FAs (FAME, do inglês, *fatty acid methyl ester*) que são altamente voláteis (140). No GC-FID, a amostra, após separação no GC, sofre combustão em chama de hidrogénio/ar sintético, formando iões e eletrões livres (148). As partículas carregadas produzem um fluxo de corrente mensurável no espaço entre os dois elétrodos no detetor (148). O fluxo de corrente resultante é de maior força do que o sinal produzido pelo gás de arraste puro e pela chama de gás de combustível sozinha (148). Este sinal fornece informações sobre a amostra (148). A amostra passa numa chama de hidrogénio/ar para oxidar moléculas orgânicas e, assim, produzir partículas eletricamente carregadas (iões). Os iões são coletados e produzem um sinal elétrico que é então medido. A corrente é proporcional à informação que depende da composição da amostra separada (148). A análise dos FAs totais de óleos de sementes de frutos foi realizada por GC-FID para sementes de maçã (39), pera (39), papaia (86), abóbora (83), uva (85), tâmara (87), framboesa (72), cereja (27), nectarina (27), pêssigo (27), ameixa (27), amora (35), sabugueiro (35), figo-da-Índia (36), romã (48), kiwi (37) e goiaba (37). A GC-MS foi utilizada na análise de FAs nos óleos de sementes de maracujá (73), abacate (32), laranja (38), melancia (44), alperce (3), amendoim (3), marmelo (3) e mirtilo (45). Ambas as técnicas foram usadas

na análise de FAs de sementes de melão (142). Para as sementes de azeitona, o perfil de FAs tem sido analisado por GC-FID (31) e por GC-MS (71,76,77).

A separação de lípidos após a extração e/ou fracionamento por TLC ou SPE pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high-performance liquid chromatography*) que permite separar misturas com múltiplos componentes. A HPLC é uma cromatografia em coluna que bombeia uma amostra ou mistura de analito para um solvente (fase móvel) a alta pressão através de uma coluna (fase estacionária) (149). A HPLC tem a capacidade de separar compostos, que estão presentes em qualquer amostra que possa ser dissolvida num líquido, em concentrações mínimas (149). À medida que a amostra passa pela coluna, ela interage entre as duas fases numa taxa diferente, principalmente devido a diferentes polaridades nos analitos (149). Os analitos que possuem a menor quantidade de interação com a fase estacionária ou a maior afinidade com a fase móvel eluem da coluna mais rapidamente (149).

A HPLC pode ser acoplada a MS, combinando uma técnica de separação física com uma técnica de análise. Os espectrómetros de massa consistem em três componentes básicos: fonte de ionização, analisador e detetor. Em lipidómica, a fonte de ionização mais utilizada é o electrospray (ESI, do inglês, *electrospray ionization*) e, no que diz respeito aos analisadores mais utilizados, são o quadrupolo com tempo de voo (Q-TOF, do inglês, *quadrupole-time-of-flight*), a trapa de iões, a orbitrap e o triplo quadrupolo (149). A MS fornece dois níveis de informação: primeiro, a identificação (espectro de MS, “full MS”) e, segundo, a identidade estrutural dos componentes individuais com alta especificidade molecular e sensibilidade de deteção (espectro de MS/MS ou MS tandem) (140). Dependendo das características estruturais das espécies moleculares lipídicas, os espectros de massa são adquiridos no modo de ionização positiva ou negativa. O espectro de massa tandem (MS/MS) de cada ião permite confirmar a identidade estrutural de cada molécula. Nos espectros de MS/MS, é possível observar iões-fragmentos típicos de cada classe lipídica ou perdas neutras características, originado(a)s a partir do ião precursor, permitindo identificar a estrutura da(s) molécula(s). Por exemplo, através do MS/MS é possível determinar a composição das cadeias acil de um TAG, ou o grupo cabeça polar e as cadeias acil de um lípido polar (140). A HPLC-MS e a HPLC-MS/MS têm a vantagem de separar diferentes classes de lípidos, como TAGs e lípidos polares. No caso dos TAGs, a separação é baseada no comprimento das cadeias acil, enquanto nos lípidos polares, a separação é feita por polaridade. As colunas de fase normal utilizadas na cromatografia líquida são

revestidas de sílica não modificada, com os seus grupos silanol livres. No entanto, as colunas de fase reversa contêm hidrocarbonetos de cadeia longa ligados covalentemente à superfície da sílica. A mais usada é a C18, que contém grupos octadecilsilil (140). Em óleos de sementes de frutos, a ESI-MS tem sido utilizada para a análise do perfil de TAGs nos óleos de sementes de azeitona (76) e sementes de tâmara-das-Canárias (*Phoenix canariensis*) (75). A análise qualitativa do perfil de TAGs no óleo de sementes de papaia foi realizada utilizando HPLC-MS (86). No entanto, a análise de TAGs no óleo de sementes de uva foi realizada por MALDI-MS (MALDI, do inglês, *matrix assisted laser desorption ionization*) (85). Para a análise de lípidos polares de sementes de frutos, especificamente PLs e GLs, poucos são os estudos que recorreram a HPLC-MS e HPLC-MS/MS. No óleo de sementes de abacate (*Persea americana* Mill), foi utilizado HPLC-ESI-MS/MS para a caracterização simultânea de espécies moleculares de GLs e PLs (121). No caso do óleo de sementes de azeitona foi utilizada eletroforese capilar não-aquosa (NACE, do inglês, *non-aqueous capillary electrophoresis*) acoplada a ESI-MS (115).

Em lipidómica, existem diferentes níveis de quantificação de lípidos. A quantificação relativa de grupos ou classes de lípidos pode ser obtida por gravimetria ou por testes colorimétricos após fracionamento por TLC ou SPE. A nível molecular, a quantificação relativa ou absoluta é realizada através de LC-MS. A quantificação relativa permite identificar o perfil de cada classe de lípidos. Para isso, é necessário calcular a área do pico de cada ião da respetiva classe. De modo a determinar a abundância relativa de cada espécie lipídica dentro da classe selecionada, é necessário normalizar cada pico pela soma total das áreas de todos os picos. Por outro lado, para a quantificação absoluta de cada espécie molecular por LC-MS, é necessário construir uma curva de calibração para cada espécie a ser quantificada. No caso das sementes de frutos, as quantidades relativas das diferentes classes lipídicas foram descritas na secção 1.2.

Em conclusão, as metodologias utilizadas em lipidómica incluem várias etapas, a extração lipídica (métodos de Soxhlet, Folch e Bligh & Dyer), seguida de fracionamento (SPE e TLC), a análise e identificação de lípidos, no caso de FAs através de GC-MS e GC-FID, e de TAGs e lípidos polares por HPLC-MS e HPLC-MS/MS.

1.4. Propriedades bioativas dos óleos de sementes de frutos e potenciais aplicações biotecnológicas

Atualmente, os óleos de algumas sementes de frutos são utilizados para diversas aplicações biotecnológicas. Estes óleos de sementes têm propriedades bioativas *in vitro*, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-proliferativa, e antimicrobiana, contribuindo para a sua valorização em diversos segmentos da indústria.

Os métodos mais comumente utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais e de sementes são os testes ABTS, DPPH• e ORAC (150). A atividade antioxidante de óleos de sementes tem sido avaliada principalmente pelo ensaio de captação do radical DPPH•. Este ensaio consiste na medida espectrofotométrica da intensidade da cor em solução, dependendo da quantidade do radical DPPH• estável (150). Quando ocorre a redução do radical DPPH•, ocorre diminuição da absorvência durante a reação. O radical DPPH• pode aceitar um radical de elétrons ou hidrogénio, e a formação da nova molécula estável corresponde à diminuição da intensidade de absorção. Assim, a solução com o radical perde a cor violeta, ficando amarela (151). Este método é amplamente utilizado em extratos contendo lípidos por ser um método rápido e conveniente, com boa estabilidade (151). Para determinar a atividade antioxidante do extrato, calcula-se a concentração efetiva a 50% (EC₅₀, do inglês, *effective concentration at 50%*). O valor de EC₅₀ representa a concentração efetiva de extrato que reduz a absorvência do DPPH• em 50% devido à doação de hidrogénio por um composto antioxidante (150). Portanto, valores baixos de EC₅₀ indicam que o extrato tem uma forte atividade antioxidante (152). Alguns estudos avaliaram a atividade antioxidante de óleos extraídos de sementes de frutos (Tabela 7), embora não existam ainda estudos sobre a atividade antioxidante do óleo de sementes de azeitona.

Tabela 7. Atividade antioxidante de alguns óleos de sementes de frutos

Material	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	DPPH _{rem} (%)	EC ₅₀ (g óleo/g [DPPH•])	Referências
Maracujá	-	48,00 ± 0,74	10,62	(73)
Maçã ¹	40,06 x 10 ⁻³	-	-	(153)
Uva	21,32	-	-	(154)
Mirtilo	9,5	-	-	(45)

¹Para o óleo de sementes de maçã, a atividade antioxidante foi testada em diferentes concentrações. DPPH_{rem} – menos de 10% da concentração inicial.

Os resultados obtidos para o óleo de sementes de maracujá revelaram que a percentagem de DPPH• restante (DPPH_{rem} (%)) após 30 minutos de reação foi de 48%, indicando que o óleo possui atividade de captação de radicais livres (73). O óleo de sementes de maçã, recuperado a partir destas sementes derivadas de bagaço industrial de diferentes variedades deste fruto (Red Delicious, Golden Delicious, Royal Delicious e Red Chief), mostrou uma atividade antioxidante dependente da concentração (153). O valor de EC₅₀ foi muito superior (40,06 µg mL⁻¹) ao do padrão de um antioxidante de referência, o hidroxianisol butilado (BHA, do inglês, *butylated hydroxyanisole*) (9,97 µg mL⁻¹), (153,154). No entanto, o EC₅₀ era muito inferior do que em outras variedades de maçã (8,34 mg mL⁻¹ em Fuji e 7,91 mg mL⁻¹ em New Red Star) (153). Como é possível verificar na Tabela 7, a atividade antioxidante *in vitro* do óleo de sementes de maçã é superior à dos óleos de mirtilo e uva. Em conclusão, os estudos sobre a atividade antioxidante *in vitro* de óleos de sementes de frutos pelo ensaio de DPPH• demonstraram que estes óleos possuem elevada atividade antioxidante e têm potencial para serem utilizados como antioxidantes naturais como fonte alimentar ou adicionados a produtos alimentares, aumentando a estabilidade e a qualidade dos mesmos.

Outra propriedade bioativa que é pouco relatada em óleos de sementes de frutos é a atividade anti-inflamatória. Nos ensaios *in vitro* avalia-se o efeito inibitório dos extratos lipídicos na produção de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO, do inglês, *nitric oxide*), induzidos por um lipopolissacarídeo (LPS), em linhas celulares de macrófagos de ratinho (células RAW 246.7). O NO é um marcador inflamatório tardio formado pela ativação da sintase induzida pelo óxido nítrico (iNOS, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*) (155). Fazio *et al.* (2012) utilizaram extratos metanólicos de sementes de amora silvestre (*Rubus ulmifolius* Schott) e de sabugueiro (*Sambucus nigra*

L.) para comparar as suas propriedades anti-inflamatórias *in vitro* (35). O extrato de sementes de amora diminuiu a libertação de NO de forma dependente da concentração, com quase 60% de inibição na dose mais alta (50 µg mL⁻¹) (35). Em contraste, o extrato de sabugueiro não afetou significativamente a produção de NO (35). Este estudo mostrou que os extratos metanólicos de sementes de amora são capazes de diminuir a inflamação *in vitro*, inibindo o NO induzido por LPS em macrófagos (35). Em conclusão, estas sementes foram consideradas uma fonte valiosa de agentes anti-inflamatórios naturais para a saúde humana e foram sendo sugeridas como aditivos alimentares, e para serem usadas como ingredientes em cosméticos e em aplicações farmacêuticas (4). Para o óleo de sementes de azeitona ainda não foram levados a cabo estudos sobre esta atividade.

A atividade anti-proliferativa dos óleos de sementes de frutos tem sido também pouco relatada e ainda não há estudos utilizando o óleo de sementes de azeitona. Foram, no entanto, avaliados os efeitos anti-proliferativos e citotóxicos *in vitro* do extrato etanólico da semente de manga Waterlily (*Mangifera indica* L.), em duas linhas celulares de cancro da mama humano (células MCF-7 e MDA-MB-231) (156). Estas células foram expostas a concentrações de 5,0, 10 e 50 µg mL⁻¹ de extrato e os resultados mostraram que a percentagem de sobrevivência das células MCF-7 após 24, 48 e 72 h de incubação com 10 µg mL⁻¹ de extrato foi de 96%, 77% e 52%, respetivamente (156). As células MDA-MB-231, tratadas de forma semelhante, não mostraram tanta redução na viabilidade quanto as células MCF-7, com valores de 98%, 93% e 71%, respetivamente (156). Os autores concluíram que o extrato etanólico da semente de manga é significativamente citotóxico para as células MCF-7 e MDA-MB-231, com o potencial de ser usado futuramente no tratamento do cancro da mama (156).

A atividade antimicrobiana de óleos de sementes de frutos, e especificamente dos lípidos polares que os compõem, tem sido pouco relatada. Para avaliar a atividade antimicrobiana de um agente ou composto é usual determinar a sua concentração mínima inibitória (MIC, do inglês, *minimum inhibitory concentration*). A MIC é a concentração mais baixa de agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo num determinado período de tempo. A MIC depende do microrganismo em estudo e do agente antimicrobiano em causa. Os métodos de referência utilizados para determinar as MICs dos agentes antimicrobianos *in vitro* são os métodos de diluição e microdiluição em caldo de agar ou agar sólido (157). A diluição em caldo de agar, frequentemente avaliada no formato de placas de

microtitulação de 96 poços, consiste em inocular as bactérias num meio de crescimento líquido, na presença de diferentes concentrações de um agente antimicrobiano. O crescimento é avaliado por leitura da densidade ótica (DO), após a incubação por um período de tempo definido (16 a 20 h), e o valor da MIC é determinado (158).

O efeito de um agente antibacteriano depende, entre outros fatores, da estrutura da parede celular bacteriana. As bactérias Gram-positivas possuem uma membrana citoplasmática e uma parede celular de mureína espessa, composta por muitas camadas, enquanto as bactérias Gram-negativas são caracterizadas pela presença de duas membranas distintas, denominadas membrana interna e externa (159,160) e uma fina parede celular de mureína entre elas (161). As membranas das bactérias são formadas por lípidos que, na maioria dos casos, são PLs, como PE, PG, cardiolipina (CL), PI, PA e PS (161). As PEs são os principais PLs das bactérias Gram-negativas e de alguns *Bacillus* Gram-positivos. Os PGs são amplamente encontrados e também são o principal grupo de lípidos da superfície estreptocócica. Os principais lípidos de membranas presentes em *Staphylococcus aureus* são PG, CL e lisil-PG (162,163). O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) tem sido amplamente utilizado como modelo de bactérias Gram-positivas, em ensaios de atividade antimicrobiana, uma vez que estas bactérias são agentes causadores de várias doenças, incluindo as da corrente sanguínea, sistema respiratório e sistema urinário (164) e algumas doenças de pele, nomeadamente dermatite atópica e úlceras (165).

Em alguns estudos, estudou-se a atividade antimicrobiana de extratos lipídicos de plantas. Salvador *et al.* (2002) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas da família Amaranthaceae extraídos com hexano, acetato de etilo e etanol, e de extratos de ASGs obtidos a partir dessas plantas, em várias espécies de bactérias Gram-positivas e negativas, e leveduras patogénicas (166). Para tal, usaram o método de antibiograma em meio de cultura sólido. A mistura de ASGs mostrou-se ativa contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (estirpes ATCC 25923 e 7+), *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *S. mutans* (estirpe 9.1) e *S. sobrinus*, com as seguintes MICs: 50 µg mL⁻¹, 50 µg mL⁻¹, 500 µg mL⁻¹, 50 µg mL⁻¹, 500 µg mL⁻¹ e 500 µg mL⁻¹, respetivamente (166). Previamente, Bibel *et al.* (1992) tinham demonstrado a atividade antimicrobiana de esfingosinas e PLs (PA, éster monometílico do PA, dioleoil-PE, β-oleoil-γ-palmitoil-PE e PC) em diferentes estirpes de *S. aureus*, bactérias gram-negativas e do fungo leveduriforme *Candida albicans* (167).

Com exceção da atividade antioxidante, existem poucos estudos científicos realizados com óleos de sementes de frutos que demonstrem a sua atividade biológica, nomeadamente antimicrobiana. Portanto, é necessário investir neste campo, uma vez que estas sementes, nomeadamente as sementes de azeitona, são subprodutos da indústria agroalimentar com impacto ambiental negativo, que podem ser recuperados para produzir compostos de grande interesse comercial. Acresce o facto de os óleos de sementes de frutos serem fontes de lípidos com valor nutricional e cosmético/farmacêutico. Além de serem ricos em TAGs, cujos FAs são monoinsaturados e polinsaturados, esses óleos contêm outros lípidos, como os lípidos polares, que foram pouco explorados e cuja diversidade e quantidade são potencialmente benéficos à saúde.

1.5. Objetivo

O objetivo deste trabalho será estudar o perfil lipídico do óleo de sementes de azeitona. Em particular, será analisado o perfil dos seus principais componentes (ácidos gordos totais e triacilgliceróis) e das diferentes classes de lípidos polares, utilizando uma abordagem metodológica baseada em lipidómica. Além disso, será também determinada a atividade antimicrobiana de extratos lipídicos do óleo de sementes de azeitona para investigar o seu potencial bioativo. A variedade Arbequina, uma cultivar de alto valor económico, será utilizada como modelo para se ter uma visão da composição lipídica deste óleo como fonte promissora de lípidos derivados da agroindústria com potenciais aplicações biotecnológicas.

2. Material e Métodos

2.1. Material, reagentes e equipamento

Nos diferentes procedimentos laboratoriais foram utilizados solventes orgânicos (clorofórmio, metanol, 2-propanol, *n*-hexano e éter dietílico) com grau de pureza de HPLC, exceto a acetona e o etanol que tinham grau de pureza para análise, e foram adquiridos à Fischer Scientific Ltd. (Loughborough, Reino Unido). Sempre que necessário foi utilizada água ultrapura (Synergy, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). Para os diferentes procedimentos foram utilizados os seguintes reagentes adquiridos a fontes comerciais reconhecidas: molibdato de amónio (Panreac Química, Barcelona, Espanha), di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado, hidróxido de amónio a 25% e ácido fórmico para espectrometria de massa ca. 98% (Fluka, Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha), ácido perclórico a 70% (Chem-lab NV, Zedelgem, Bélgica), ácido ascórbico, ácido acético glacial e cloreto de sódio (VWR Chemicals, Prolabo, Leuven, Bélgica), orcinol, D-glucose, acetato de amónio, primulina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), ácido sulfúrico a 96% (Acros Organics, Geel, Bélgica), hidróxido de potássio (Honeywell, Charlotte, NC, EUA) e trietilamina (Fischer Scientific Ltd.). Para a TLC foram utilizadas placas de vidro revestidas com sílica gel 60 (20 x 20 cm) e com zona de concentração (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os padrões de lípidos polares utilizados para a preparação de uma mistura para ser utilizada na otimização do processo de fracionamento e também utilizados para comparação na TLC foram todos adquiridos à Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, EUA), exceto o padrão de ASG (ref. 1118, Matreya LLC, State College, PA, EUA). Também foram utilizados outros padrões de lípidos para a TLC do extrato lipídico total, como descrito na secção 2.4: trioleína (18:1-18:1-18:1, ref. Y000111, Sigma Aldrich), linoleato de colesterol (18:2CE, ref. C0289, Sigma Aldrich), ácido oleico (18:1, ref. O1008-1G, Sigma Aldrich) e colesterol (lã ovina, > 98%, ref. 700000, Avanti Polar Lipids). Estes padrões foram utilizados sem purificação e foram preparados em stocks de 1,0 mg e dissolvidos em 1,0 mL de clorofórmio.

Os padrões de lípidos utilizados para a análise do perfil molecular de lípidos polares por HPLC-ESI-MS/MS foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, Inc.: 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (dMPC); 1-nonadecanoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC); *N*-palmitoil-d-eritro-esfingosilfosforilcolina (NPSM); 1,2-

dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (dMPE); 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (dMPG); 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-l-serina (dMPS); 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilinositol (dPPI); 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato (dMPA); e *N*-heptadecanoil-d-eritro-esfingosina (C17 Cer(d35:1)).

Na análise do perfil de FAs foi utilizada uma mistura de padrões de FAMES (Supelco 37 Component FAME Mix, ref. CRM47885) e como padrão interno foi utilizado o metil-nonadecanoato a $\geq 98\%$, C19:0CH₃ (ref. N5377) ambos da Sigma-Aldrich.

Durante o trabalho prático foram utilizados vários equipamentos: centrífuga de bancada (PrO-Analytical, Centurion Scientific Ltd., West Sussex, Reino Unido), banho de água (Precistern, JP Selecta, S.A.), placa de aquecimento (SBH200D/3, Stuart, Bibby Scientific Ltd., Stone, Reino Unido), espectrofotómetro de UV-visível (Multiskan GO, Thermo Scientific, Hudson, NH, EUA), microcentrífuga (Gusto High-Speed Mini Centrifuge, Heathrow Scientific, IL, EUA), lâmpada de ultravioleta (UV 254 nm, Camag, Berlin, Alemanha), banho de ultrassons (P-Selecta, JP Selecta, S.A., Barcelona, Espanha), cromatógrafo de fase gasosa (Agilent Technologies 6890 N Network, Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrómetro de massa (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), espectrómetro de massa híbrido Q-TOF2 (Micromass, Manchester, Reino Unido), e um sistema de HPLC (UltiMate 3000™ UHPLC, Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha) acoplado on-line a um espectrómetro de massa híbrido quadrupolo-orbitrap (Q Exactive™ HF, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha).

2.2. Amostras

As azeitonas foram recolhidas na campanha 2018/2019, em duas regiões geográficas diferentes, Canas de Senhorim e Oliveira de Barreiros, freguesias pertencentes ao concelho de Nelas (Viseu, Portugal), região de produção oleícola e vitivinícola e gentilmente cedidas por Cooperativa de Olivicultores de Nelas, C.R.L. No laboratório, as azeitonas foram selecionadas, evitando frutos deteriorados ou contaminados, depois foram lavadas duas vezes com água corrente para remover pó e sujidade, de seguida foram lavadas uma vez com água destilada e, por fim, foram secas com um pano. A polpa foi removida com uma faca e descartada e o caroço foi quebrado cuidadosamente com um martelo para recuperar as sementes. Estas foram removidas

com uma pinça e durante o procedimento foram sendo colocadas num recipiente de vidro a 4 °C. Foram armazenadas a -20 °C para posterior extração lipídica.

2.3. Extração total de lípidos para obtenção do óleo de sementes

Para extrair os lípidos totais das sementes de azeitona, foram macerados ca. 300 mg de sementes com um pilão e almofariz usando 6,5 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1, em volume). A mistura resultante foi transferida para um tubo de vidro Pyrex, bem homogeneizada, e deixou-se em gelo durante 3 horas para promover a extração de lípidos, homogeneizando num vortex a cada 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de água ultrapura para induzir a formação de duas fases, a fase orgânica que contém os lípidos e a fase aquosa. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 142 g e a fase orgânica foi transferida para outro tubo de vidro Pyrex. Os extratos lipídicos (óleo) foram concentrados utilizando uma corrente de nitrogénio e, de seguida, foram dissolvidos em clorofórmio, transferidos para frascos de vidro âmbar de 4,0 mL, e secos novamente em nitrogénio, com posterior determinação do rendimento gravimétrico da extração lipídica. Este processo foi repetido 5 vezes no mesmo dia ($n = 5$) para cada grupo de amostras. Depois de obtido o óleo, foram preparados stocks de ca. 5,0 mg em frascos de vidro âmbar de 2,0 mL, por transferência de volumes adequados do óleo, dissolvido em clorofórmio, a partir dos frascos de 4,0 mL. Por fim, os extratos lipídicos, nos frascos de vidro âmbar de 2,0 mL, foram concentrados em nitrogénio e foi determinada a sua massa rigorosa.

Para determinação do rendimento gravimétrico da extração lipídica e da massa rigorosa dos stocks de ca. 5,0 mg, os frascos de 4,0 mL e de 2,0 mL tinham sido secos previamente duas horas a 105 °C numa estufa e depois mantidos num exsiccador. Os frascos vazios foram pesados sem tampa antes da transferência do extrato lipídico e após a evaporação completa do solvente orgânico com os lípidos. Os extratos secos foram armazenados a -20 °C até análise posterior.

2.4. Separação das principais classes de lípidos do óleo de sementes

Para visualizar a composição do óleo de sementes de azeitona nos seus grupos principais de acilgliceróis recorreu-se à TLC. Inicialmente, lavou-se uma placa de sílica até 1,0 cm do topo, numa câmara de eluição, com uma mistura de clorofórmio/metanol (1:1, em volume), com um volume final de 50 mL, deixando depois a placa a secar

durante 15 minutos. A placa foi impregnada com ácido bórico a 2,3% em etanol para ativação dos grupos silanol da sílica e seca numa estufa a 100 °C por 15 min. Em seguida, foram aplicados, na zona de concentração da placa, de forma equidistante, uma quantidade de óleo equivalente a 20-30 µg de PLs e 10 µg de cada padrão de lípidos dissolvidos em clorofórmio. A placa foi colocada numa câmara de eluição saturada com uma mistura de *n*-hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:1, em volume), a migração demorou cerca de 1 hora e ocorreu à temperatura ambiente, deixando-se depois a placa a secar por 30 minutos na hotte. A revelação das bandas lipídicas foi realizada com recurso à luz UV, após a placa ser borrifada com uma solução de primulina (50,0 mg/100,0 mL de acetona/água, 80:20, em volume).

2.5. Quantificação de fosfolípidos

Para estimar a quantidade de PLs nos extratos lipídicos, utilizou-se o ensaio de fósforo, de acordo com Rouser *et al.* (1970) (168). Em primeiro lugar, ligou-se o bloco de aquecimento a 180 °C e marcou-se os tubos de quantificação das amostras e dos padrões de fosfato, em duplicado. Utilizaram-se tubos de vidro Pyrex lavados previamente em ácido nítrico a 5%. Dissolveram-se os extratos lipídicos em clorofórmio e transferiu-se 10,0 µL de cada amostra para o respetivo tubo. Secou-se completamente os lípidos em corrente de nitrogénio e adicionou-se 125,0 µL de ácido perclórico a 70%. Colocou-se uma esfera de cristal no topo de cada tubo e aqueceu-se os tubos a 180 °C, durante 40-60 minutos, para a hidrólise lipídica. Entretanto, preparou-se os padrões de fosfato para construção de uma reta de calibração, em diferentes concentrações (0,0 a 20,0 µg mL⁻¹), em duplicado, com uma solução-padrão de fosfato de sódio monobásico di-hidratado (NaH₂PO₄, 100 mg mL⁻¹), 125,0 µL de ácido perclórico a 70%, água ultrapura de modo a perfazer 1,0 mL em cada tubo, e homogeneizou-se bem. Após a hidrólise ácida das amostras, adicionou-se, à temperatura ambiente, 825,0 µL de água ultrapura, 125,0 µL de solução aquosa de molibdato de amónio di-hidratado a 2,5% (massa/volume) e 125,0 µL de solução aquosa de ácido ascórbico a 10% (massa/volume), homogeneizando os tubos entre cada adição. Procedeu-se do mesmo modo para os padrões de fosfato. Colocou-se as amostras e padrões num banho-maria, a 100 °C, durante 10 minutos, e depois, colocou-se a arrefecer em água fria. Por fim, transferiu-se 200,0 µL de cada tubo, em duplicado, para uma microplaca de 96 poços, e leu-se as absorvências no comprimento de onda de 797

nm. Para determinar a quantidade de fósforo nas amostras, foi traçada uma reta de calibração com os valores de absorvência dos padrões e as concentrações de fósforo conhecidas, sendo através da equação da reta que se calculou a quantidade de fósforo. Para estimar a quantidade de PL, multiplicou-se o valor obtido (em μg de fósforo inorgânico) por 25, um fator de conversão que representa a massa média de um PL quando dividida pela massa do fósforo ($m = 30,97$). Este procedimento foi realizado nos extratos lipídicos totais e nos extratos fracionados após SPE, como referido nas secções 2.8.3, 2.8.5 e 2.11.1.

2.6. Quantificação de glicolípidos

Para estimar a quantidade de GLs nos extratos lipídicos, utilizou-se o método do orcinol (169), detalhado em (170). Inicialmente, marcou-se tubos de quantificação para as amostras e para padrões de glucose, em duplicado, e preparou-se uma solução de orcinol (1,3-dihidroxi-5-metilbenzeno) em ácido sulfúrico a 70% (0,2%, massa/volume) e uma solução-padrão de D-glucose em etanol absoluto ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$, massa/volume). Preparou-se tubos para construir uma reta de calibração com diferentes concentrações ($0,0$ a $40,0 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$) da solução de D-glucose em etanol absoluto, sendo o solvente evaporado em corrente de nitrogénio. Dissolveram-se os extratos lipídicos em clorofórmio, transferiu-se $60,0 \mu\text{L}$ de cada amostra para o respetivo tubo, e secou-se completamente os lípidos em corrente de nitrogénio. Seguidamente, adicionou-se $1,0 \text{ mL}$ da solução de orcinol em ácido sulfúrico a 70% aos tubos das amostras e dos padrões. Colocou-se os tubos num bloco de aquecimento a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 minutos, sendo depois arrefecidos num banho de água fria. Por fim, transferiu-se $200,0 \mu\text{L}$ de cada amostra e padrão, em duplicado, para cada poço de uma microplaca de 96 poços e leu-se as absorvências no comprimento de onda de 505 nm . Para determinar a quantidade de glucose, foi traçada uma reta de calibração com os valores da absorvência dos padrões e as concentrações de glucose conhecidas, sendo através da equação da reta que se calculou a quantidade de glucose nas amostras. Para estimar a quantidade de GL, multiplicou-se o valor obtido (em μg de glucose) pelo fator de conversão $100/35$ (171). Este procedimento foi realizado nos extratos lipídicos totais e nos extratos fracionados após SPE como descrito nas secções 2.11.1 e 2.11.2.1.

2.7. Análise do perfil de ácidos gordos totais

Para a análise do perfil de FAs totais no óleo de sementes de azeitona, procedeu-se à transesterificação das amostras para obtenção de FAMES, segundo o procedimento descrito por Aued-Pimentel *et al.* (2004) (172). A técnica de análise utilizada foi a GC-MS. Os FAMES foram obtidos da seguinte forma: partindo dos stocks de ca. 5,0 mg de óleo dissolvido em clorofórmio, foram transferidos volumes equivalentes a 15,0 µg de óleo para tubos de vidros de extração, previamente lavados com *n*-hexano, sendo depois o solvente evaporado em corrente de nitrogénio. De seguida, foi adicionado 1,0 mL de padrão interno 19:0CH₃ em *n*-hexano (2,0 mg L⁻¹, massa/volume) e 200,0 µL de uma solução de hidróxido de potássio (2,0 M) em metanol e a mistura foi homogeneizada durante 90 segundos. Depois, foi adicionado 1,0 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio (1% em água ultrapura, massa/volume) e a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 142 g. De seguida, foram retirados 800,0 µL da fase orgânica (fase superior) para um microtubo e completamente secos em corrente de nitrogénio. Por fim, redissolveu-se a amostra seca em 200,0 µL de *n*-hexano e injetou-se 2,0 µL no cromatógrafo de fase gasosa.

O cromatógrafo estava equipado com uma coluna DB-FFAP com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme (J&W Scientific, Folsom, CA, EUA) e conectado a um detetor de massa seletivo de rede 5973, da Agilent, operando em modo de impacto eletrónico de 70 eV e varrendo o intervalo de *m/z* 40-500, num ciclo de 1 segundo, no modo de aquisição *full-scan*. A temperatura do forno foi programada partindo de uma temperatura inicial de 80 °C, permanecendo nessa temperatura por 0,5 min, seguida de um aumento linear para 160 °C a 25 °C min⁻¹, depois de 2 °C min⁻¹ até 190 °C e, finalmente, a 40 °C min⁻¹ até 230 °C. As temperaturas do injetor e do detetor foram definidas para 220 °C e 280 °C, respetivamente. O gás de arraste utilizado foi hélio numa taxa de fluxo de 4,2 mL min⁻¹.

A abundância relativa de cada FAME foi determinada considerando a área de cada pico do cromatograma com normalização apropriada à soma das áreas de todos os FAMES identificados. A identificação dos FAMES foi realizada por comparação do seu tempo de retenção e espectro de massa com a mistura de padrões comerciais de FAME (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich). Além disso, para identificação dos FAMES, recorreu-se à base de dados de espectros de massa de FAMES da Wiley, incluída no software do programa de análise de dados do cromatógrafo, e à biblioteca de

espectros da LipidWeb (173). Este procedimento foi realizado para todas as 5 amostras das duas regiões geográficas.

2.7.1. Análise estatística dos dados

A abundância relativa de cada FA, dos SFAs, MUFAs e PUFAs, e dos seus rácios, nos extratos lipídicos totais foi comparada, entre as duas regiões geográficas, usando uma análise de variância com um factor (*one-way* ANOVA), em que a região geográfica foi definida como fator preditivo, com dois níveis: Canas de Senhorim e Oliveira de Barreiros. A avaliação de normalidade e homogeneidade de variância foram verificadas usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente. Estas análises foram realizadas com o pacote estatístico R versão 3.2.1 (174). O nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

2.7.2. Determinação de índices lipídicos

O perfil de FAs totais de uma matriz alimentar permite calcular índices lipídicos. Estes índices foram formulados no sentido de determinar a probabilidade de um alimento estar associado a risco de doença cardiovascular, com base nos SFAs, MUFAs e PUFAs. Utilizando o perfil de FAs totais, foram calculados os IA e IT do óleo de sementes de azeitona, segundo Ulbricht & Southgate (1991) (61), utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Fórmula (1) Índice de aterogenicidade: } \frac{4 \times \text{C14:0} + \text{C16:0}}{(n-6+n-3) + \text{C18:1} + \sum \text{MUFA}}$$

$$\text{Fórmula (2) Índice de trombogenicidade: } \frac{\text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0}}{0,5 \times \text{C18:1} + 0,5 \times \sum \text{MUFA} + 0,5 \times (n-6) + 3 \times (n-3) + \frac{n-3}{n-6}}$$

2.8. Otimização do processo de fracionamento do óleo de sementes para aumentar a eficiência da recuperação dos lípidos polares

O procedimento utilizado correntemente no laboratório de lipidómica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (DQUA) para fracionamento de óleos e matrizes lipídicas ricas em óleo é baseado num método de SPE com colunas de sílica gel funcionalizadas com grupos aminopropilo (SPE-NH₂) adaptado de Ruiz *et al.* (2004) (175). Este procedimento foi utilizado em tecido adiposo (176), gema de ovo (177) e polpa de azeitona (138) mas não permite recuperar, com os sistemas de

solventes utilizados, a totalidade dos lípidos polares, nomeadamente os lípidos polares acídicos que ficam fortemente retidos na coluna. Com o procedimento referido são recuperados até 25% dos PLs e dos GLs. Assim, foi necessário otimizar o processo de fracionamento de uma mistura complexa de lípidos polares por SPE com colunas NH₂ para aumentar a eficiência de recuperação destes compostos. Para isso, testou-se diferentes eluentes polares numa mistura de padrões de lípidos comerciais.

2.8.1. Preparação de uma mistura de padrões de lípidos polares

Para a otimização do processo de fracionamento do óleo de sementes de azeitona foi preparada uma mistura equimolar de padrões de diferentes classes de lípidos polares encontrados em matrizes biológicas, incluindo classes presentes em matrizes vegetais: PLs (PA, PE, PC, PG, PI, PS, LPC e SM), GLs (DGDG, MGDG e SQDG), esfingolípidos (galactosilceramida, GalCer) e betaínas (diacilgliceril-*N,N,N*-trimetil-homoserina, DGTS). Partindo de stocks de 1,0 mg de cada padrão de lípidos, dissolveu-se em 1,0 mL de clorofórmio e transferiu-se 100,0 µL para um frasco de vidro âmbar de 2,0 mL, perfazendo 1,3 mL. A mistura foi homogeneizada e levada à secura em corrente de nitrogénio. Foi armazenada a -20 °C até análise.

2.8.2. Fracionamento da mistura de padrões de lípidos polares por extração em fase sólida com diferentes sistemas de solventes

Neste trabalho, foram testados três sistemas de solventes para a extração em fase sólida da mistura de padrões de lípidos polares.

No primeiro sistema, testou-se o eluente polar utilizado por Ruiz *et al.* (2004) (175) para obter os lípidos polares neutros ou zwitteriónicos e que consistia numa mistura de metanol/clorofórmio (6:1, por volume), doravante denominado eluente (3), seguido de uma mistura de metanol/clorofórmio (1:1, por volume), como anteriormente usado no laboratório de lipidómica do DQUA (138,177).

No segundo sistema, testou-se o eluente polar (3), seguido de outro eluente polar para obter os lípidos polares acídicos ou aniónicos (PG, SQDG, PA, PS e PI), descrito por Suzuki *et al.* (1993) (178) e, mais tarde, utilizado numa matriz vegetal por Christie *et al.* (1998) (179). Esse eluente consistia numa mistura de solventes com maior força iónica, doravante denominado eluente (4): clorofórmio/metanol/hidróxido de amónio a 28% com 0,05 M de acetato de amónio (4:1:0,1, por volume).

No terceiro sistema, testou-se o eluente polar (3), seguido de outro eluente polar com maior polaridade que permitiu recuperar os lípidos polares ainda mais acídicos (PI e PA), e que foi descrito por Kim & Salem (1990) (180), doravante denominado eluente (5): *n*-hexano/2-propanol/etanol/0,1 M de acetato de amónio aquoso/ácido fosfórico (420:350:100:50:0,5, por volume).

Para testar os três sistemas acima referidos, foram utilizadas colunas de SPE-NH₂ (capacidade 3 mL, peso da fase estacionária 500 mg, Discovery DSC-NH₂, ref. 52637-U Supelco, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) que foram adaptadas a um coletor a vácuo (Visiprep SPE Vacuum Manifold, ref. 57030-U, Supelco, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). As colunas foram condicionadas com 6,0 mL de *n*-hexano, para ativar a superfície da sílica e remover impurezas que pudessem interferir na análise, e carregadas com 100,0 µg da mistura de padrões de lípidos polares dissolvidos em 200,0 µL de clorofórmio. Em cada um dos protocolos, fez-se eluir os lípidos com 8,0 mL de cada eluente (três sistemas, cada um com dois eluentes), sendo a respetiva fração recolhida para tubos de vidro e levada à secura em corrente de nitrogénio. Às frações obtidas com o eluente (4) e com o eluente (5), depois de secas, foram adicionados 3,0 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1, por volume) e 750,0 µL de água ultrapura, para remoção do sal, e do sal e da água, respetivamente. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 142 g, e a fase orgânica que continha os lípidos foi transferida para outro tubo de vidro. O processo foi repetido nos tubos onde a fração tinha sido recolhida. Por fim, os extratos lipídicos foram concentrados em nitrogénio, dissolvidos em clorofórmio e transferidos para frascos de vidro âmbar, onde foram levados à secura e armazenados em atmosfera inerte e refrigerados a -20 °C.

2.8.3. Quantificação de fosfolípidos nas frações enriquecidas em lípidos polares

A quantificação de PLs nas frações enriquecidas em lípidos polares obtidas após fracionamento da mistura de padrões, como descrito na secção anterior, pretendeu verificar que quantidade de PLs era obtida com cada um dos eluentes, tendo em conta a quantidade teórica aplicada na coluna de sílica. Ou seja, a mistura continha 13 padrões (todos os referidos na secção 2.8.1, à exceção do padrão de ASG) em que 8 deles eram padrões de PLs. Nos 100,0 µg da mistura que foi aplicada na coluna, existirão 62,0 µg de PLs. O procedimento utilizado para a quantificação de PLs foi descrito na secção 2.5.

2.8.4. Cromatografia em camada fina das frações enriquecidas em lípidos polares

Após o fracionamento da mistura de padrões por SPE-NH₂, foram obtidas duas frações enriquecidas em lípidos polares para cada sistema de solventes testados. Para separar as classes dos lípidos polares, recorreu-se à TLC com um eluente polar. Inicialmente, lavou-se uma placa de sílica até 1,0 cm do topo numa câmara com clorofórmio/metanol (1:1, em volume), com um volume final de 50 mL, e deixou-se a placa a secar durante 15 minutos. Em seguida, borrifou-se a placa com uma solução de ácido bórico a 2,3% e deixou-se a placa a secar durante 10 minutos. Colocou-se a placa na estufa, a 100 °C, durante 15 minutos, e deixou-se a placa arrefecer à temperatura ambiente. Em seguida, foram aplicados, na zona de concentração da placa, de forma equidistante, 20,0-30,0 µg de PLs, quantificados no passo anterior, de cada uma das frações obtidas assim como 10,0 µg de cada padrão de lípidos dissolvidos em clorofórmio, e a zona de concentração foi seca em corrente de nitrogénio. Colocou-se a placa numa câmara de eluição saturada com uma mistura de clorofórmio/etanol/água /trietilamina (30:35:7:35, em volume). A eluição demorou cerca de 3 horas, à temperatura ambiente e, de seguida, deixou-se a placa secar totalmente na hotte. Por fim, borrifou-se a placa com uma solução de primulina (50,0 mg/100,0 mL acetona/água, (80:20, em volume), e por último, deixou-se secar durante 15 minutos e, após secagem, visualizou-se as bandas sob luz UV.

2.8.5. Quantificação de fosfolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina das frações enriquecidas em lípidos polares com os diferentes eluentes

O procedimento utilizado para a quantificação de PLs nas bandas obtidas após TLC das frações enriquecidas em lípidos polares com os diferentes eluentes é semelhante ao descrito na seção 2.5. Após visualização da migração dos lípidos na placa de sílica, raspou-se as bandas correspondentes às classes de PLs, para tubos de vidro, para proceder ao ensaio de fósforo. Como, neste caso, os lípidos estavam retidos na sílica, foi necessário, após os 10 minutos em ebulição no banho-maria, remover a sílica dos tubos, transferindo-se 1,0 mL do conteúdo do tubo de vidro para microtubos e centrifugando-se a 1000 rpm, durante 5 minutos, numa microcentrífuga. Por fim, transferiu-se 200,0 µL de sobrenadante para uma microplaca de 96 poços, em

duplicado, e leu-se as absorvências a 797 nm. Seguiu-se o procedimento referido na secção 2.5, para estimar a quantidade de cada classe de PL recuperada.

2.8.6. Preparação do novo sistema de solventes e avaliação da recuperação de lípidos polares após extração em fase sólida da mistura de padrões de lípidos polares

Depois de avaliar a recuperação das diferentes classes de lípidos polares com os três sistemas anteriormente referidos, pretendeu-se testar a recuperação da totalidade das classes de lípidos polares na mistura de padrões. A mistura de padrões consistiu nas mesmas classes de lípidos polares referida na secção 2.8.1, com a adição de um outro padrão, de ASG, que está reportado para matrizes de origem vegetal, nomeadamente sementes. Assim, a nova mistura continha 14 padrões em quantidade equimolar. Para o fracionamento da mistura, foi elaborado um novo protocolo que utilizava um sistema de três eluentes polares. No protocolo, realizado em triplicado, foram utilizadas colunas de SPE-NH₂, como referido anteriormente (secção 2.8.2), adaptadas a um coletor de vácuo com tubos de recolha de vidro, e consistiu em: **a)** condicionar a coluna com 6,0 mL de *n*-hexano; **b)** carregar a coluna com 100,0 µg da mistura de padrões de lípidos polares dissolvidos em 200,0 µL de clorofórmio; **c)** descartar o eluente e trocar de tubo; **d)** eluir os lípidos com 12,0 mL de eluente (3); **e)** 12,0 mL de eluente (4); **f)** e 12,0 mL de eluente (5). Os eluentes utilizados consistiam nas seguintes misturas de solventes:

Eluente (3): metanol/clorofórmio (6:1, por volume);

Eluente (4): clorofórmio/metanol/hidróxido de amónio a 25% com 0,05 M de acetato de amónio (4:1:0,1, por volume);

Eluente (5): hexano/2-propanol/etanol/0,1 M de acetato de amónio em água/ácido fórmico (420:350:100:50:0,5, por volume).

O sistema de solventes utilizado para a SPE da mistura de padrões foi adaptado dos três sistemas de solventes testados anteriormente. As proporções dos eluentes foram iguais às referidas anteriormente (secção 2.8.2) mas, no eluente (5), substituiu-se o ácido fosfórico por ácido fórmico, uma vez que o ácido fosfórico interferia na quantificação de PLs e na análise por MS.

Entre cada um dos passos de eluição, a pressão do coletor de vácuo foi reduzida a zero para abertura do coletor, retirada do tubo de recolha de eluente e troca por novo

tubo de vidro. Às frações de lípidos polares obtidas com os eluentes (4) e (5), depois de concentradas em corrente de nitrogénio, foram adicionados 3,0 mL de clorofórmio/metanol (2:1, por volume) e 750,0 µL de água ultrapura, a mistura foi centrifugada durante 5 minutos a 142 g, e a fase orgânica foi transferida para outro tubo de vidro. Este processo foi repetido nos tubos onde a fração foi recolhida. Por fim, os extratos lipídicos foram concentrados em corrente de nitrogénio, dissolvidos em clorofórmio/metanol (2:1, por volume), juntamente com a fração dos lípidos polares obtida com o eluente (3), e transferidos para frascos de vidro âmbar de 2,0 mL. Estes extratos, resultantes da eluição com os eluentes (3), (4) e (5), corresponderiam à totalidade de lípidos polares.

De seguida, procedeu-se à quantificação de PLs e de GLs nestes extratos através dos procedimentos descritos nas secções 2.5. e 2.6. Depois, foi realizada uma TLC, para visualização das bandas de lípidos recuperadas e, por fim, a quantificação de PLs e de GLs nas bandas separadas após TLC, de acordo com os procedimentos descritos nas secções 2.8.5 e 2.6, respetivamente. Após verificar que todas as classes da mistura de padrões foram recuperadas com elevado rendimento, prosseguiu-se para o fracionamento do óleo de sementes de azeitona.

Ainda antes de testar este protocolo no óleo de sementes de azeitona, testou-se a SPE apenas com os eluentes, na ausência de lípidos, para avaliar a possibilidade de contaminação nas amostras pelos eluentes ou arrastamento dos componentes da coluna na análise posterior por MS.

2.9. Fracionamento do óleo de sementes de azeitona em lípidos neutros, lípidos de polaridade intermédia e lípidos polares

Uma vez avaliada a eficiência da recuperação de lípidos polares no processo de fracionamento da mistura de padrões, como descrito na secção 2.8.6, fracionou-se o óleo de sementes de azeitona nas amostras de Canas de Senhorim ($n = 5$).

Utilizaram-se colunas de sílica (Discovery DSC-NH₂, lot. N°. 7250701, ref. 52637-U Supelco, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) que foram adaptadas a um coletor de vácuo (Visiprep SPE Vacuum Manifold, ref. Supelco-57030-U, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). As colunas foram condicionadas com 6,0 mL de *n*-hexano e carregadas com ca. 8,0 mg de óleo de sementes de azeitona dissolvido em 200,0 µL de clorofórmio. Fez-se eluir os lípidos neutros com 25,0 mL de clorofórmio (eluente (1)). Os lípidos de polaridade intermédia, como esteróis e FAs livres, foram eluídos com 10,0

mL de uma mistura de éter dietílico/ácido acético (98:2, por volume) (eluente (2)). A recuperação dos lípidos polares foi obtida em três frações, de acordo com o processo otimizado (secção 2.8). Primeiro, foram eluídos com 12,0 mL de metanol/clorofórmio (6:1, por volume) (eluente (3)), 12,0 mL de clorofórmio/metanol/hidróxido de amónio a 28% com 0,05 M de acetato de amónio (4:1:0,1, por volume) (eluente (4)), e por último, com 12,0 mL de hexano/2-propanol/etanol/0,1 M de acetato de amónio em água/ácido fórmico (420:350:100:50:0,5, por volume) (eluente (5)). As cinco frações foram recolhidas para tubos de vidro e concentradas em nitrogénio. Depois, aos tubos contendo as frações de lípidos neutros e de lípidos de polaridade intermédia foi adicionado o solvente de eluição, ou seja, clorofórmio e éter dietílico/ácido acético (98:2, em volume), respetivamente, para transferir os lípidos para frascos de vidro âmbar, onde foram concentrados em nitrogénio. Os lípidos da segunda e terceira frações de lípidos polares, depois de concentrados em nitrogénio, foram re-extraídos com 3,0 mL de clorofórmio/metanol (2:1, em volume) e 750,0 µL de água ultrapura, para remoção do sal, e do sal e da água, respetivamente. A mistura foi centrifugada durante 5 minutos a 142 g, e a fase orgânica contendo os lípidos foi transferida para outro tubo de vidro. Este procedimento foi repetido nos tubos onde o extrato foi recolhido. Por fim, os extratos lipídicos foram concentrados utilizando uma corrente de nitrogénio, dissolvidos em clorofórmio/metanol (2:1, por volume) juntamente com a primeira fração dos lípidos polares e transferidos para frascos de vidro âmbar. De seguida, procedeu-se à quantificação de PLs e GLs na fração de lípidos polares, como descrito nas secções 2.5. e 2.6. Por fim, foi realizada a TLC da fração de lípidos polares como descrito na secção 2.8.4 e a quantificação de PLs e de GLs nas bandas separadas por TLC correspondentes a PLs e GLs, como descrito nas secções 2.8.5 e 2.6, respetivamente.

2.10. Análise da fração enriquecida em lípidos neutros

Após o fracionamento do óleo de sementes de azeitona obteve-se uma fração enriquecida em lípidos neutros, maioritariamente TAGs, mas também ésteres de estero.

2.10.1. Determinação da massa de lípidos neutros

A massa de lípidos neutros foi estimada por gravimetria que consistiu em: pesar os frascos de vidro âmbar vazios sem tampa; transferir o extrato de lípidos neutros dissolvidos em clorofórmio para respetivo frasco; evaporar o solvente em nitrogénio; e

pesar o extrato seco numa balança. Para determinar a massa de lípidos neutros, calculou-se a diferença da massa dos frascos com amostra e sem amostra. Depois, calculou-se a percentagem de lípidos neutros no óleo de sementes, tendo em conta a quantidade utilizada para o fracionamento (ca. 8,0 mg).

2.10.2. Análise do perfil de triacilgliceróis

A identificação de TAGs no óleo de sementes de azeitona foi realizada a partir da primeira fração obtida após SPE, rica em lípidos neutros. A análise do perfil de TAGs foi realizada por ESI-MS direto, num espectómetro Q-ToF 2 (Micromass, Reino Unido), no modo de ionização positiva. A partir da fração de lípidos neutros obtida anteriormente, foi preparado, num tubo de vidro âmbar, uma solução de 1,0 mg de lípido dissolvida em 1,0 mL de clorofórmio. A partir desta solução, foram retirados 2,0 µL para um microtubo previamente lavado com metanol, contendo 198,0 µL de metanol com acetato de amónio (5,0 mmol L⁻¹). O volume final de 200,0 µL foi injetado no espectrómetro de massa, para obtenção do espectro de MS. A taxa de fluxo da amostra aplicada foi de 10 µL min⁻¹, a temperatura da fonte de ionização era de 80 °C e a temperatura de desolvatação era de 150 °C. As condições de ESI-MS foram as seguintes: a voltagem do cone foi definida para 30 V e a voltagem do electrospray para 3 kV. A resolução (largura do pico a meia altura) foi definida para aproximadamente 9.000. Para as análises de MS/MS com dissociação induzida por colisão foi utilizado árgon como gás de colisão (pressão ~ 6x10⁻⁵ mBar) e a energia de colisão utilizada variou entre 22 e 25 eV. A aquisição de dados e o tratamento dos dados foram realizados com o software MassLynx V4.0 (Waters, Manchester, Reino Unido). Os iões de TAGs foram identificados como aductos de amónio ([M+NH₄]⁺) na região de *m/z* 760-950, numa aquisição média de 1 minuto. A caracterização estrutural das espécies moleculares de TAGs foi obtida após a análise do espectro de MS/MS de cada aducto de [M+NH₄]⁺, de acordo com o padrão de fragmentação conhecido (181).

2.11. Análise da fração enriquecida em lípidos polares

Na fração enriquecida em lípidos polares (junção das frações obtidas com os eluentes **3**, **4** e **5**), estimou-se a quantidade de PLs e de GLs totais, realizou-se a separação das classes de lípidos por TLC, estimou-se novamente a quantidade de PLs e

de GLs nas bandas lipídicas separadas, e analisou-se o perfil molecular de lípidos polares por HPLC-ESI-MS/MS.

2.11.1. Quantificação de fosfolípidos e de glicolípidos

Os procedimentos utilizados para a quantificação de PLs e de GLs na fração enriquecida em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona foram descritos nas seções 2.5. e 2.6., respetivamente.

2.11.2. Cromatografia em camada fina

Para separar as classes da fração de lípidos polares do óleo de sementes de azeitona recorreu-se à TLC, como descrito na secção 2.8.4. Os extratos lipídicos dissolvidos em clorofórmio foram aplicados na zona de concentração da placa em função da quantidade de PL (30,0 µg) para permitir a separação e visualização das diferentes classes destes lípidos.

2.11.2.1. Quantificação de fosfolípidos e de glicolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina

A quantificação de PLs e de GLs nas bandas obtidas após TLC, correspondentes a PLs e GLs, foi realizada como descrito nas seções 2.8.5 e 2.6, respetivamente.

2.11.3. Análise do perfil molecular de lípidos polares

A análise do perfil de lípidos polares do óleo de sementes de azeitona obtidos na fração enriquecida foi realizada por HPLC-ESI-MS e HPLC-ESI-MS/MS. Os compostos foram separados por polaridade através da cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC). Foi utilizada uma coluna de fase normal Ascentis Si HPLC Pore (15 cm x 1,0 mm, 3 µm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e um sistema de UHPLC (Ultimate 3000 Dionex, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) com um injetor automático acoplado online a um espectrómetro de massa Q Exactive Orbitrap (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha). O sistema de solventes era composto por duas fases móveis: o eluente A constituído por 50% de acetonitrilo, 25% de metanol e 25% de água com 1,0 mM de acetato de amónio e o eluente B constituído por 60% de acetonitrilo e 40% de metanol com 1,0 mM de acetato de amónio. Para a análise, adicionou-se em frascos de vidro com *inserts*, 91,0 µL de uma mistura de 90% de eluente B com 10% de eluente A, 5,0 µL de amostra dissolvida em clorofórmio e 4,0

μL da mistura de padrões internos dissolvida em clorofórmio: PE(14:0-14:0) (0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), PA(14:0-14:0) (0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), PC(14:0-14:0) (0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), PI(16:0-16:0) (0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) e LPC(19:0) (0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$). Uma alíquota de 5,0 μL desta mistura foi introduzida na coluna e mantida a 30 °C. O caudal foi ajustado para 40 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o gradiente do solvente foi definido da seguinte forma: a eluição iniciou-se com 40% do eluente A, que foi mantida isocraticamente por 8 minutos, seguida de um aumento linear para 60% do eluente A em 7 minutos e mantida por 5 minutos. De seguida, as condições voltaram às condições iniciais em 15 minutos (5 minutos para diminuir para 40% o eluente A e um período de reequilíbrio de 10 minutos antes da próxima injeção). A aquisição no espectrómetro de massa foi realizada nos modos de ionização positiva (3,0 kV) e negativa (-2,7 kV), com resolução de 70.000 e num intervalo de massas entre m/z 200-1600. Para a aquisição dos espectros de MS/MS, utilizou-se uma resolução de 17.500, um intervalo de massas de m/z 200-2000, e um isolamento de 1,0 m/z . Utilizou-se uma abordagem de aquisição dependente de dados em que os ciclos consistiram na aquisição de um espectro de massa “*full-scan*” e dez espectros de MS/MS. Repetiram-se estes ciclos, com uma exclusão dinâmica de 60 segundos e o limite mínimo de intensidade de 1×10^4 para que fosse induzida a fragmentação dos iões observados no espectro de massa. A fragmentação foi induzida por colisão de alta energia usando nitrogénio como gás de colisão. Utilizou-se uma energia de colisão normalizada que variou entre 25, 30 e 35 eV e cujos espectros de MS/MS combinaram a fragmentação obtida com as três energias. A aquisição de dados foi realizada usando o software Xcalibur (V3.3, Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.11.4. Análise dos dados

A identificação das espécies moleculares de lípidos polares foi baseada na atribuição dos iões precursores observados nos espectros de HPLC-MS e massa exata com erro igual ou inferior a 5 ppm, e na identificação do padrão de fragmentação conhecido de cada classe observada nos espectros de MS/MS de cada ião, conforme descrito na literatura (181), e tempo de retenção esperado.

Os dados obtidos foram processados com recurso ao software MZmine, versão 2.39 (182). Primeiro, a lista de massas foi filtrada, seguida pela deteção de picos e processamento dos picos. Durante o processamento dos dados brutos, adquiridos no modo de varrimento total, foram considerados apenas os picos com intensidade bruta superior a 1×10^4 e com uma tolerância de massas igual ou inferior a 5 ppm. A atribuição

dos picos e a identificação dos íons baseadas nas massas exatas foram realizadas em bases de dados internas de lípidos polares, criadas a partir da base de dados LIPID MAPS®.

A quantificação relativa dos lípidos polares foi calculada para as famílias de lípidos polares (PLs, GLs, esfingolípidos e esteróis glicosilados acilados) e para as classes de lípidos polares dentro de cada família. A quantificação relativa foi realizada usando os valores da área do pico cromatográfico de cada íon. A normalização dos dados foi realizada dividindo as áreas dos íons correspondentes às espécies moleculares de cada classe pela área dos íons que foram designados como padrão interno de cada classe (182). Como não foi utilizado um padrão interno para as classes MGDG, DGDG, ASG e HexCer, os picos respectivos foram normalizados para o padrão interno de ceramida, que tinha o mesmo tempo de retenção. Além disso, as classes SQDG, SQMG e *N*-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) foram normalizadas para o padrão interno de PG pelo mesmo motivo.

2.12. Avaliação da atividade antimicrobiana dos lípidos polares

Existem poucos estudos sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* dos lípidos polares de plantas e, tanto quanto se sabe, não foram reportados estudos sobre esta atividade em extratos de sementes de azeitona enriquecidos em lípidos polares. Nesse sentido, foram realizados, neste trabalho, ensaios preliminares de determinação da MIC bacteriana usando uma bactéria Gram-positiva como modelo, o MRSA. Foi utilizado o método de referência da microdiluição em caldo de agar (183).

2.12.1. Preparação de meios de cultura e solução-tampão

Para o crescimento da estirpe bacteriana em meio líquido e para a preparação do inóculo bacteriano, foi necessário preparar meios de cultura líquidos. Para preparar o meio de caldo de soja tripticase (TSB, do inglês *trypticase soy broth*), foram pesados 12,0 g de meio TSB (Liofilchem, Itália) e dissolvidos em 400 mL de água destilada. O pH foi ajustado para $7,3 \pm 0,2$ e depois o meio foi distribuído em frascos de vidro (30 mL por frasco), e esterilizado em autoclave, a 121 °C, durante 20 minutos. Para preparar a solução-tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*), pesou-se 4,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,1 g de cloreto de potássio (KCl), 0,72 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e 0,12 g de fosfato monopotássico (KH₂PO₄). Dissolveu-se os reagentes em 500 mL de água destilada num frasco de vidro rolhado. O pH da solução

foi ajustado para 7,4 com HCl e, em seguida, foi adicionada água destilada até ao volume final (500 mL). O tampão foi esterilizado em autoclave por 20 minutos, a 121 °C.

2.12.2. Estirpe bacteriana, condições de crescimento e preparação do inóculo

Foi utilizada a estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (DSM 25693). A estirpe encontrava-se armazenada a -80 °C em glicerol a 10% (por volume). Antes de cada ensaio, a cultura-stock de bactérias foi inoculada aseticamente em 30 mL de meio TSB e incubou durante 18 horas, a 37 °C, com agitação orbital (120 rpm). De seguida, transferiu-se aseticamente uma alíquota (300 µL) da cultura bacteriana para um frasco com 30 mL de TSB fresco e incubou durante 18 horas, a 37 °C, com agitação orbital (120 rpm). Antes de cada ensaio, preparou-se o inóculo, partindo da cultura bacteriana crescida *overnight* (pré-inóculo), que consistiu em transferir, aseticamente, cultura para um novo frasco de TSB (30 mL), até acertar a densidade ótica (DO) a 600 nm, a 0,09.

2.12.3. Padrões de lípidos polares e extratos lipídicos testados

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados dois conjuntos de ensaios. Primeiro, realizaram-se três ensaios independentes para testar a atividade de padrões de lípidos polares comerciais na presença de bactéria. Foram testados padrões correspondentes às classes identificadas na fração de lípidos polares após a análise por TLC (secção 2.11.2) e por HPLC (secção 2.11.3): PLs (PA, PI, PE, PG e PC), GLs (DGDG, MGDG e SQDG), esfingolípidos (GalCer) e ASGs. Preparou-se, em vials âmbar de 2,0 mL, stocks de 1,0 mg de cada padrão de lípidos, que foram dissolvidos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a -20 °C até à realização dos ensaios de atividade. Depois, realizaram-se três ensaios independentes para testar a atividade das frações enriquecidas em lípidos polares obtidas após fracionamento do óleo de sementes de azeitona com o processo otimizado de SPE-NH₂ (descrito na secção 2.9). As frações obtidas, depois de levadas à secura em nitrogénio, foram dissolvidas em diclorometano e filtradas com filtros de seringa de porosidade 0,22 µm para um novo vial. Procedeu-se do mesmo modo para cada uma das dez amostras, evaporando depois o solvente em corrente de nitrogénio. A amostra foi armazenada a -20 °C até à realização dos ensaios de atividade. O fracionamento das amostras de Canas

de Senhorim e de Oliveira de Barreiros ($n = 10$) permitiu obter um total de 1220 μg de lípidos polares.

2.12.4. Determinação da concentração mínima inibitória pelo ensaio da microdiluição em caldo

Nos ensaios com os padrões de lípidos, começou-se por adicionar 100 μL do inóculo a cada poço da microplaca para cada padrão de lípido e ainda 100 μL do inóculo num poço com 50 μL de PBS para um controlo negativo (controlo bactéria) e 100 μL do inóculo num poço com 50 μL de DMSO para um controlo do veículo (controlo DMSO). Aos poços da microplaca onde foram aplicados os padrões, foram adicionados 50 μL de cada stock de padrão de lípido dissolvido em DMSO, correspondendo à concentração mais alta de composto (5,0 mg mL^{-1}). Depois disso, realizou-se diluições seriadas de duas vezes até à concentração mais baixa (0,01 mg mL^{-1}). O mesmo procedimento de diluição seriada foi feito a partir do poço do controlo negativo e do controlo do veículo. As placas incubaram *overnight* numa estufa a 37 °C.

Nos ensaios com os extratos lipídicos, procedeu-se da mesma forma. Ao poço da microplaca onde foi aplicado extrato, correspondendo à concentração mais alta de composto (6,1 mg mL^{-1}), foram adicionados 50 μL do stock de extrato dissolvido em DMSO. Depois disso, realizou-se diluições seriadas de duas vezes até à concentração mais baixa (0,01 mg mL^{-1}). Nestes ensaios realizou-se a leitura da DO_{600} na placa antes da incubação e após a incubação.

2.12.5. Análise estatística dos dados

A ANOVA de duas vias seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett foi usada para avaliar as diferenças entre os padrões de lípidos e os controlos (DMSO e bactéria) nas diferentes concentrações de compostos e entre o extrato lipídico e os controlos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. As análises foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 8.3.0 (328) para Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla California EUA). O nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

3. Resultados

Neste trabalho, caracterizou-se o lipidoma do óleo de sementes de azeitona Arbequina colhida em duas regiões geográficas de Nelas, nomeadamente Canas de Senhorim e Oliveira de Barreiros (região do Dão, Portugal). A identificação dos componentes lipídicos foi feita usando técnicas de cromatografia e espectrometria de massa, contribuindo assim para a valorização destas sementes e do seu óleo como subprodutos agroindustriais. Deste modo, procedeu-se à extração dos lípidos totais do óleo de sementes de azeitona, seguida de fracionamento do mesmo e posterior análise, com o intuito de estudar o perfil lipídico.

3.1. Obtenção do óleo de sementes de azeitona

Após a extração dos lípidos totais, o rendimento gravimétrico do óleo de sementes de azeitona obtido foi, em média, 78,70 mg e 40,54 mg para o grupo de Canas de Senhorim e Oliveira de Barreiros, respetivamente (Tabela 8). Obteve-se um rendimento de extração de 24,15% e de 12,70%, o que significa que as sementes de azeitona Arbequina tinham 24,15 mg e 12,70 mg de lípidos por 100 mg de biomassa, para os grupos de Canas de Senhorim e Oliveira de Barreiros, respetivamente.

Tabela 8. Valores da massa de óleo de sementes de azeitona Arbequina obtidas de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal) e rendimento em óleo após extração lipídica

	Canas de Senhorim	Oliveira de Barreiros
Massa inicial (peso da toma de sementes, mg)	325,94 ± 14,98	319,24 ± 8,53
Massa obtida (extrato lipídico total, mg)	78,70 ± 8,47	40,54 ± 20,30
Rendimento em óleo (%)	24,15 ± 0,57	12,70 ± 2,38

Os valores representam médias ± desvios padrões de cinco repetições biológicas ($n = 5$).

3.2. Separação das classes de lípidos que compõem o óleo

Para saber as principais classes de lípidos que compõem o óleo de sementes de azeitona, foi realizada uma TLC do extrato lipídico total. Na placa de cromatografia foram aplicados os extratos lipídicos e os padrões de lípidos conhecidos para proceder à comparação com as bandas visualizadas nas amostras de óleo. Após a revelação da

placa (Figura 9), observou-se várias bandas: uma banda com uma migração próxima da frente da corrida, correspondente a ésteres de esterol (banda 9); uma banda maioritária com migração ao nível do padrão de TAG (banda 8); uma banda ao nível do padrão do FA 18:1, correspondente a FAs livres (banda 7); uma banda mais ténue, ao nível do padrão de colesterol, correspondente a esteróis (banda 5); e uma banda localizada próximo do ponto de aplicação, ao nível do padrão de PL (PC), correspondente a uma fração de lípidos polares (banda 1). Para além destas, observou-se também uma banda que migrou acima da banda de esteróis (banda 6) que, de acordo com o perfil reportado para acilgliceróis presentes em matrizes semelhantes, e usando um sistema de eluição semelhante, poderá corresponder a diacilgliceróis (DAGs), outra inferior (banda 4) que poderá corresponder a monoacilgliceróis (MAGs) e duas bandas correspondentes a outras classes lipídicas não identificadas (bandas 2 e 3). Comparando a TLC das amostras do óleo de sementes de azeitona dos dois grupos, verificou-se algumas diferenças, nomeadamente nas do grupo de Canas de Senhorim (ω), em que as bandas 3 e 7 eram mais intensas do que no grupo de Oliveira de Barreiros (ρ).

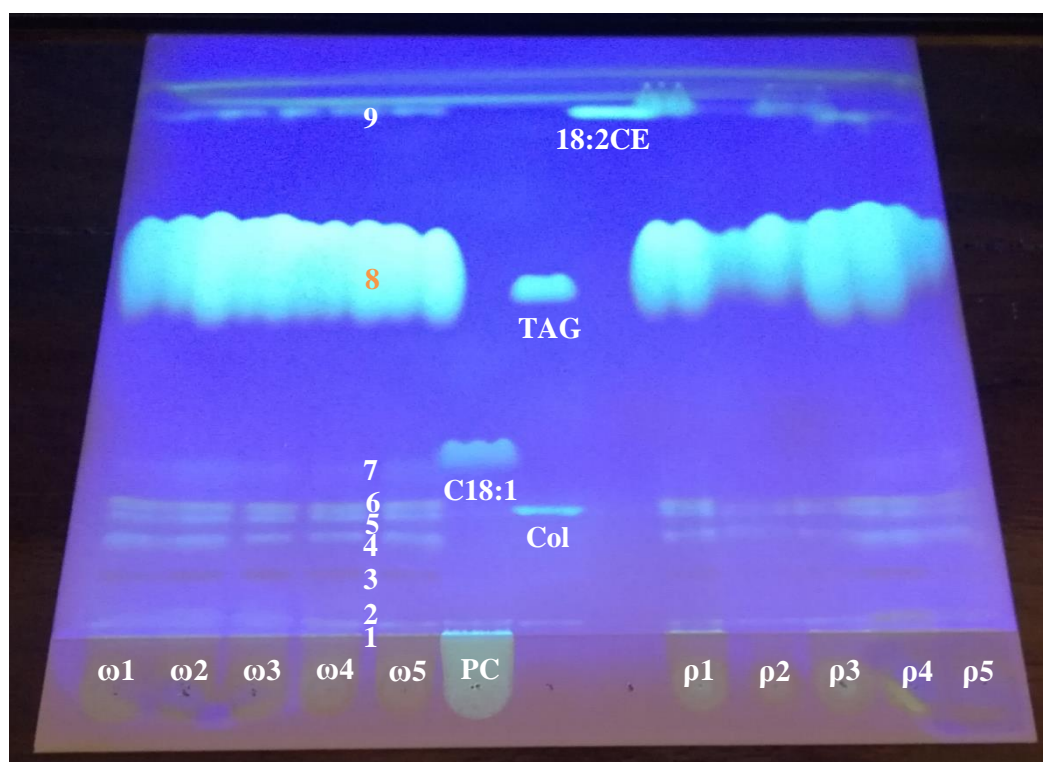


Figura 9. Cromatografia em camada fina do óleo de sementes de azeitona Arbequina, de duas regiões geográficas de Nelas, de dez réplicas biológicas (ω 1, ω 2, ω 3, ω 4 e ω 5, relativas a Canas de Senhorim; e ρ 1, ρ 2, ρ 3, ρ 4 e ρ 5, relativas a Oliveira de Barreiros).

Abreviaturas: PC, fosfatidilcolina; 18:1, ácido oleico; Col, colesterol; TAG, triacilglicerol; 18:2CE, 18:2 colesterol éster.

3.3. Perfil de ácidos gordos totais

O perfil de FAs no extrato lipídico total foi analisado por GC-MS, tendo sido identificados doze FAs (Tabela 9). Os FAs maioritários foram, por ordem decrescente, o 18:1 n -9 (63,07-65,44%), o 18:2 n -6 (16,83-19,15%) e o 16:0 (12,08-12,59%). Os FAs presentes em menor percentagem foram, por ordem decrescente, o 18:0 (3,98-4,19%), o 20:0 (0,48-0,56%), o 20:1 n -11 (0,20-0,23%), o 16:1 n -11 (0,18-0,20%), o 17:0 (0,15-0,17%), o 14:0 (0,07-0,11%), o 18:3 n -3 (0,08-0,09%), o 22:0 (0,04-0,06%) e o 15:0 (0,02-0,03%). O conteúdo de MUFAs, PUFAs e SFAs foi de 63,45-65,87%, 16,93-19,23% e 17,20-17,32%, respetivamente. Além disso, no extrato lipídico total, a razão MUFA/SFA variou entre 3,66 e 3,83, isto é, a quantidade de MUFAs era cerca de quatro vezes superior à quantidade de SFAs. Por outro lado, a razão MUFA/PUFA variou entre 3,30 e 3,89 e a razão n -6/ n -3 variou entre 178,05 e 244,02.

Tabela 9. Perfil de ácidos gordos do óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal) e valores de p da análise de variância com um fator (*one-way* ANOVA)

	Oliveira de Barreiros	Canas de Senhorim	
Ácidos gordos	Abundância relativa (%)	Abundância relativa (%)	Valor de p
C14:0	0,11 ± 0,08	0,07 ± 0,03	N.S.
C15:0	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	N.S.
C16:0	12,08 ± 3,02	12,59 ± 1,37	N.S.
C16:1 n -11	0,20 ± 0,10	0,18 ± 0,07	N.S.
C17:0	0,17 ± 0,05	0,15 ± 0,03	N.S.
C18:0	4,19 ± 1,66	3,98 ± 0,48	N.S.
C18:1 n -9	65,44 ± 3,75	63,07 ± 1,32	N.S.
C18:2 n -6	16,83 ± 0,88	19,15 ± 0,92	N.S.
C18:3 n -3	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	N.S.
C20:0	0,56 ± 0,18	0,48 ± 0,15	N.S.
C20:1 n -11	0,23 ± 0,06	0,20 ± 0,10	N.S.
C22:0	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01	N.S.
∑ SFA	17,20 ± 1,18	17,32 ± 0,50	N.S.
∑ MUFA	65,87 ± 2,12	63,45 ± 0,71	N.S.
∑ PUFA	16,93 ± 0,61	19,23 ± 0,64	0,0036
∑ UFA	82,80 ± 1,60	82,68 ± 0,60	N.S.
MUFA/PUFA	3,89	3,30	0,0003

MUFA/SFA	3,83	3,66	N.S.
<i>n-6/n-3</i>	178,50	244,02	0,0132

Os valores de abundância relativa em percentagem representam médias \pm desvios padrões dos óleos de sementes de azeitona Arbequina de Oliveira de Barreiros ($n = 5$) e de Canas de Senhorim ($n = 5$). Abreviaturas: 14:0, ácido mirístico; 15:0, ácido pentadecanóico; 16:0, ácido palmítico; 16:1*n*-11, ácido palmitoleico; 17:0, ácido heptadecanóico; 18:0, ácido esteárico; 18:1*n*-9, ácido oleico; 18:2*n*-6, ácido linoleico; 18:3*n*-3, ácido linolénico; C20:0, ácido araquídico; 20:1*n*-11, ácido gadoleico; 22:0, ácido beénico; SFA, ácidos gordos saturados; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; UFA, ácidos gordos insaturados; N.S., não significativo.

Os perfis de FAs dos óleos de sementes de azeitona de Canas de Senhorim e de Oliveira de Barreiros foram qualitativamente semelhantes. Foram observadas diferenças significativas para o total de PUFAs ($p = 0,0036$), para a razão MUFA/PUFA ($p = 0,0003$) e para a razão *n-6/n-3* ($p = 0,0132$).

3.3.1. Índices lipídicos

De modo a determinar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares por ingestão de óleo de sementes de azeitona, foram calculados os seus índices IA e IT com base no perfil de FAs (Tabela 10).

Tabela 10. Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) do óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal)

Índice	Canas de Senhorim	Oliveira de Barreiros	Azeite ^{a)}	Óleo de coco ^{b)}
IA	0,16 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	0,14	13,63
IT	0,40 \pm 0,05	0,34 \pm 0,04	0,32	6,18

Na tabela estão também representados os índices lipídicos calculados por Ulbricht & Southgate (1991) para o azeite (a) e para o óleo de coco (b), para comparação (61).

Os IA e IT foram calculados pela primeira vez, neste trabalho, para o óleo de sementes de azeitona. Estes índices já tinham sido calculados para o azeite, outros óleos alimentares e outros alimentos, tal como ilustrado na Tabela 10. Verificou-se que os índices calculados foram semelhantes para os óleos de sementes de azeitona de ambas

as regiões geográficas de Nelas. Comparativamente, pode-se afirmar que apesar de os índices dos óleos de sementes de azeitona serem ligeiramente mais elevados que os índices obtidos para o azeite, são bastantes baixos, comparativamente com os índices calculados para o óleo de coco.

3.4. Estimativa da quantidade de fosfolípidos e de glicolípidos no óleo de sementes de azeitona

O óleo de sementes de azeitona tinha, em média, 0,60-0,68% de PLs e 1,67-1,89% de GLs (Tabela 11). A razão GLs/PLs mostrou que o óleo de sementes de azeitona tinha cerca do triplo da quantidade de GLs relativamente à quantidade de PLs.

Tabela 11. Estimativa de fosfolípidos (PL) e de glicolípidos (GL) no óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal)

	Canas de Senhorim	Oliveira de Barreiros
<i>Fosfolípidos</i>		
g Kg⁻¹ de óleo	6,80 ± 1,20	6,00 ± 2,10
% no óleo	0,68 ± 0,12	0,60 ± 0,21
<i>Glicolípidos</i>		
g Kg⁻¹ de óleo	18,90 ± 3,50	16,70 ± 8,20
% no óleo	1,89 ± 0,35	1,67 ± 0,82
GL/PL	2,90 ± 0,89	3,21 ± 1,68

Os valores representam médias ± desvios padrões de cinco repetições biológicas ($n = 5$).

3.5. Otimização do processo de fracionamento do óleo por extração em fase sólida para a recuperação eficiente dos lípidos polares

A partir da mistura equimolar de treze padrões comerciais de lípidos polares (PA, PE, PC, PG, PI, PS, LPC, DGDG, MGDG, DGTS, SQDG, SM e GalCer) encontrados em matrizes de origem biológica, nomeadamente as de origem vegetal, realizou-se a otimização do processo de fracionamento por SPE com diferentes sistemas de solventes para testar a recuperação da totalidade dos lípidos polares.

3.5.1. Quantificação de fosfolípidos nas frações enriquecidas em lípidos polares obtidas nos três processos testados com a mistura de padrões

Após a SPE da mistura de padrões, utilizando três sistemas de solventes diferentes, procedeu-se à quantificação de PLs nas frações recuperadas. Verificou-se que o processo que permitiu recuperar uma maior percentagem de PLs foi o processo 2, por comparação com o processo 1 (Tabela 12).

Para os eluentes (3) [metanol/clorofórmio (6:1, por volume)], metanol/clorofórmio (1:1, por volume), (4) [clorofórmio/metanol/hidróxido de amónio a 25% com 0,05 M de acetato de amónio (4:1:0,1, por volume)], e (5) [*n*-hexano/2-propanol/etanol/0,1 M de acetato de amónio aquoso/ácido fosfórico (420:350:100:50:0,5, por volume)], obteve-se uma percentagem de recuperação de PLs de $33,10 \pm 6,11\%$, $4,33\%$, $87,63\%$ e $2733,51\%$, respetivamente. Constatou-se que o eluente (4) permitiu recuperar a maioria dos PLs, mas não a totalidade. A avaliação da eficiência de recuperação não foi possível para o processo 3 porque o ácido fosfórico interferiu na quantificação de PLs obtido, pois continha fósforo.

Tabela 12. Quantidade de fosfolípido (PL) total recuperado após extração em fase sólida (SPE) e percentagem de recuperação de PLs com os processos 1, 2 e 3 da otimização do fracionamento da mistura de padrões de lípidos polares ($n=1$)

Processo	Eluentes	$\mu\text{g PL aplicado na coluna (valor teórico)}$	$\mu\text{g PL obtido após SPE}$	% de recuperação
1	eluente (3) + metanol/clorofórmio (1:1)	62,0	23,03	37,43
2	eluente (3) + eluente (4)	62,0	74,30	120,73
3	eluente (3) + eluente (5)	62,0	1702,53	2766,61

3.5.2. Análise qualitativa das classes de lípidos polares recuperadas nas frações enriquecidas obtidas nos três processos testados

De modo a determinar quais as classes de lípidos polares presentes em cada uma das frações enriquecidas obtidas por SPE com os diferentes processos, foi realizada uma TLC. Após a revelação da placa (Figura 10), observou-se o aparecimento de várias bandas de lípidos polares. Para o eluente (3), verificou-se o aparecimento de bandas ao nível dos padrões de LPC, SM/DGDG, MGTS, PC, GalCer, PS/MGDG, DGTS, e PE

(bandas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, e 10, respectivamente, Figura 10, Processo 1(a)). Verificou-se, portanto, que houve co-eluição de lípidos nas bandas 2 e 7. Na fração obtida com o eluente clorofórmio/metanol (1:1, por volume), não foram observadas bandas correspondentes a lípidos polares. Por outro lado, na fração obtida com o eluente (4), (Figura 10, Processo 2(c)), observou-se uma banda ténue ao nível do padrão de PS (banda 7), outra banda também ténue ao nível do padrão de SQDG e uma banda ao nível do padrão de PG (banda 9). Por outro lado, no caso da fração obtida com o eluente (5), verificou-se o aparecimento de bandas ao nível dos padrões de PI, PS/MGDG, PG e PA (bandas 5, 7, 9, e 11, respectivamente), (Figura 10, Processo 3(d)). Além das bandas identificadas nos diferentes processos, observou-se também três bandas desconhecidas (bandas 12, 13 e 14, Figura 10) comuns a todas as frações recuperadas em cada processo, após SPE, e que presumivelmente eram artefactos das colunas de sílica, uma vez que não estavam presentes nos padrões de lípidos comerciais. O processo 3 recuperou um maior número de classes de lípidos polares, incluindo as classes de PI, PS/MGDG e PA, em comparação com os outros dois processos. Já os eluentes isoladamente não recuperaram todas as classes.

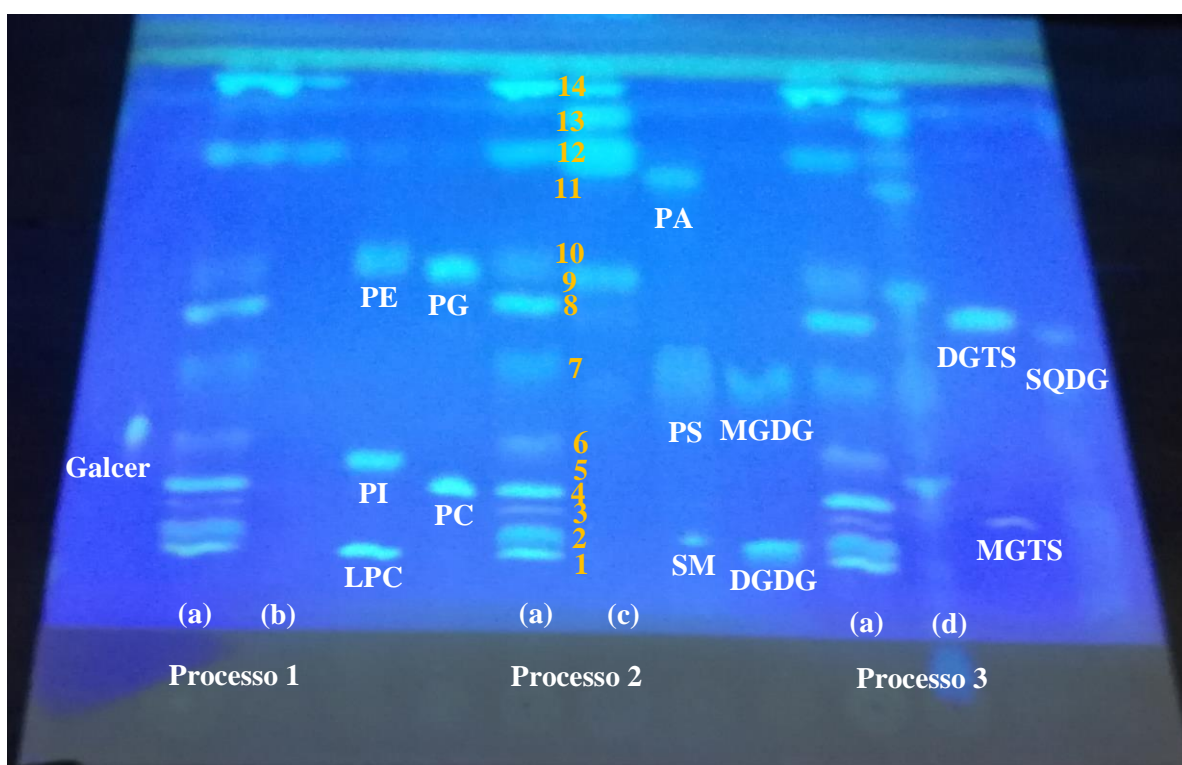


Figura 10. Cromatografia em camada fina das frações obtidas por SPE enriquecidas em lípidos polares da mistura de padrões. Abreviaturas: GalCer, galactosilceramida; LPC, lisofosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina;

PG, fosfatidilglicerol; SM, esfingomielina; PS, fosfatidilserina; PA, ácido fosfatídico; DGDG, digalactosildiacylglicerol; MGDG, monogalactosildiacylglicerol; MGTS, monoacylgliceril-*N,N,N*-trimetil-homoserina; DGTS, diacylgliceril-*N,N,N*-trimetil-homoserina; SQDG, sulfoquinovosildiacylglicerol; (a) eluente (3); (b) eluente clorofórmio/metanol (1:1, por volume); (c) eluente (4); (d) eluente (5).

3.5.3. Quantificação das classes de fosfolípidos recuperadas e separadas por cromatografia em camada fina nos três processos testados

Após a TLC, procedeu-se à quantificação de PLs nas bandas obtidas nos três processos (Tabela 13). Verificou-se que o processo 3 permitiu a recuperação de mais classes lipídicas do que os outros dois processos, tendo sido o único processo que permitiu recuperar a classe de PI (6,66%), através do eluente (5), e todas as classes de PLs. A classe de PA só foi recuperada nos processos 2 e 3 (36,77% e 6,87%, respetivamente). No caso da classe de LPC, foi recuperada em todos os processos, tendo uma maior recuperação com o processo 1 (16,59%) e de seguida, com os processos 3 e 2 (8,10% e 7,37%, respetivamente). Já para a classe de PS, verificou-se a sua recuperação nos 3 processos, sendo maior a sua percentagem de recuperação com o processo 3 (12,44%). Relativamente às classes de PE e PG, também houve recuperação em todos os processos, havendo uma maior percentagem de recuperação com o processo 3 (23,86%), seguida dos processos 2 e 1 (19,75% e 14,08%, respetivamente). Uma vez que ocorreu alguma co-eluição de PE e PG, não foi possível, com esta abordagem, distinguir uma de outra e afirmar que percentagem de recuperação se obtém para cada classe separadamente. As classes de MGTS e GalCer não contêm fósforo, mas as bandas correspondentes quantificaram fósforo em todos os processos (Tabela 13), podendo, para tal, ter ocorrido co-eluição de outras classes de PLs não identificadas pela TLC.

Tabela 13. Estimativa das classes de fosfolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina nos três processos testados

Classes lipídicas	Banda	% de cada classe relativamente ao total de classes obtidas em cada processo		
		Processo 1	Processo 2	Processo 3
LPC	1	16,59	7,37	8,10
SM ^{a)}	2	4,15	3,02	3,72
Desconhecida ^{b)}	3	3,68	2,40	1,87
PC	4	13,51	10,19	9,4
PI	5	-	-	6,66
Desconhecida ^{c)}	6	7,01	5,27	3,98
PS ^{d)}	7	10,31	3,64	12,44
PG	9	7,65	4,15	4,52
PE	10	14,08	19,75	23,86
PA	11	-	36,77	6,87
Desconhecida	12	8,74	11,10	8,17
Desconhecida	13	-	7,43	3,62
Desconhecida	14	-	-	6,56
Soma		100	100	100

^{a)} Nesta banda eluiu simultaneamente o glicolípido DGDG. ^{b)} Nesta banda eluiu simultaneamente a betaína MGTS. ^{c)} Nesta banda eluiu simultaneamente o gliscosfingolípido GalCer. ^{d)} Nesta banda eluiu simultaneamente o glicolípido MGDG. Estas quatro classes de lípidos não contêm fósforo.

3.6. Avaliação da recuperação de lípidos polares por extração em fase sólida da mistura de padrões com o novo sistema de solventes

3.6.2. Análise qualitativa das classes de lípidos polares recuperadas

Após verificar que classes de lípidos polares foram recuperadas com cada eluente e avaliar a eficiência de recuperação de cada processo, planeou-se e testou-se um protocolo otimizado, com um novo sistema de solventes, que consistia na utilização sequencial dos eluentes (3), (4) e (5), com posterior re-extração lipídica das frações enriquecidas obtidas após eluição com os eluentes (4) e (5), e junção das frações enriquecidas 3, 4 e 5 numa única fração. Para determinar as classes de lípidos polares obtidas com o novo sistema de solventes após a SPE na mistura de padrões, desta vez contendo mais um padrão de lípido, o ASG, num total de catorze, foi realizada uma TLC. Na placa de cromatografia foram aplicados os catorze padrões de lípidos polares conhecidos procedendo-se à comparação com as bandas obtidas.

Após a revelação da placa (Figura 11), observou-se o aparecimento de quinze bandas. Para a fração de lípidos polares correspondente à junção das frações obtidas com os eluentes (3), (4) e (5), verificou-se o aparecimento de bandas ao nível dos padrões de LPC, DGDG, SM, PC, GalCer, PI, MGDG, PS, PG/DGTS/SQDG, PE, PA e ASG (bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente, Figura 11, linhas F3+F4+F5 e F3'+F4'+F5'). Para o eluente (3), verificou-se o aparecimento das mesmas bandas observadas para a mistura dos três eluentes, exceto as bandas correspondentes a PI e PS (bandas 6 e 8, respectivamente, Figura 11, linha F3), sendo que a banda 9 poderá corresponder a PG, DGTS e/ou SQDG, uma vez que estes três lípidos co-eluíram na cromatografia. Já para o eluente (4), verificou-se o aparecimento de quatro bandas de lípidos polares ao nível dos padrões de PI, PS, PG/DGTS/SQDG e PA (bandas 6, 8, 9, e 11, respectivamente, Figura 11, linha F4). Por outro lado, verificou-se que o eluente (5) conseguiu recuperar PA (banda 11, Figura 11, linha F5). Além das bandas de lípidos observadas com a mistura de eluentes e com os três eluentes separadamente, surgiram três bandas não identificadas na frente da corrida (bandas 13, 14 e 15, Figura 11), e que presumivelmente eram componentes das colunas de sílica libertados durante a eluição. Através da TLC, constatou-se que a eluição sequencial com os três eluentes testados conseguiu recuperar todas as catorze classes de lípidos polares testadas, ao contrário de se usar os três eluentes em separado ou combinados dois a dois.

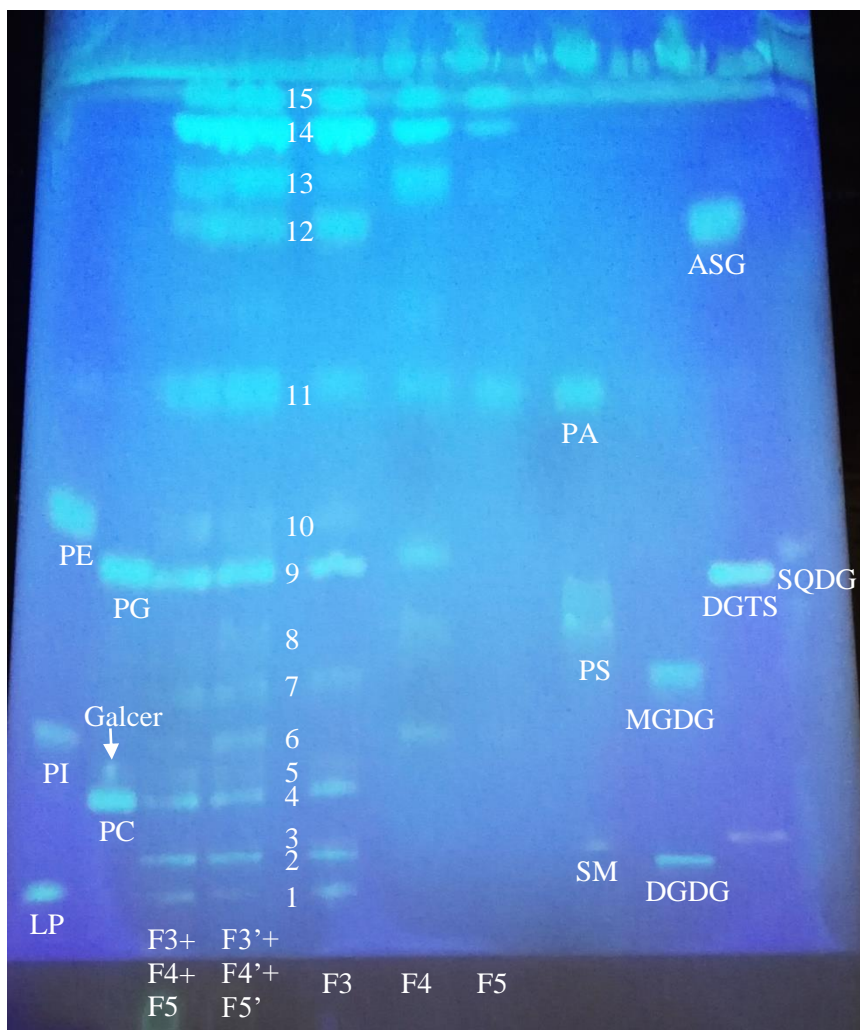


Figura 11. Cromatografia em camada fina das frações enriquecidas em lípidos polares da mistura de padrões com o novo sistema de solventes. Abreviaturas: F3, fração de lípidos polares recuperada com o eluente (3); F4, fração de lípidos polares recuperada com o eluente (4); F5, fração de lípidos polares recuperada com o eluente (5); F3+F4+F5, fração de lípidos polares recuperada com os eluentes (3), (4) e (5); F3'+F4'+F5', duplicado da fração de lípidos polares recuperada com os eluentes (3), (4) e (5).

3.6.3. Análise quantitativa das classes de lípidos polares recuperadas e separadas por cromatografia em camada fina

Após a TLC da fração enriquecida em lípidos polares obtida após SPE da mistura de catorze padrões com o novo sistema de solventes, procedeu-se à quantificação das classes de PLs das bandas obtidas. Para cada uma das oito classes de PLs utilizadas na mistura de padrões (LPC, SM, PC, PI, PS, PG, PE e PA), verificou-se

uma taxa de recuperação elevada, com valores acima de 70%, sendo o valor médio de recuperação de 100% (Tabela 14).

Tabela 14. Recuperação das classes de fosfolípidos presentes na mistura equimolar de padrões de lípidos polares comerciais utilizada para a extração em fase sólida com o novo sistema de solventes

Classes de fosfolípidos	Recuperação esperada (µg)	Recuperação obtida (Valor médio em µg)	% de recuperação
LPC	12,50	8,78 ± 1,20	70,2
SM	12,50	10,12 ± 3,37	81,0
PC	12,50	13,65 ± 3,49	109,2
PI	12,50	10,27 ± 2,79	82,2
PS	12,50	16,43 ± 3,46	131,4
PG	12,50	15,00 ± 2,99	120,0
PE	12,50	10,29 ± 1,80	82,3
PA	12,50	15,45 ± 4,37	123,6
Média	12,50	12,50 ± 1,01	100

Abreviaturas: LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; PA, ácido fosfatídico.

3.7. Fracionamento do óleo de sementes de azeitona por extração em fase sólida com o processo otimizado para a recuperação eficiente dos lípidos polares

Após a avaliação da eficiência do processo de fracionamento por SPE da mistura de padrões de lípidos polares com o novo sistema de solventes, que consistia em obter três frações eluídas com eluentes de polaridade crescente [eluentes (3), (4) e (5)] e com elevado rendimento de recuperação destes lípidos, procedeu-se ao fracionamento do óleo de sementes de azeitona. O fracionamento permitiu obter três frações enriquecidas: uma fração enriquecida em lípidos neutros, uma fração enriquecida em lípidos medianamente polares; e uma fração enriquecida em lípidos polares.

A fração correspondente aos lípidos neutros, nomeadamente a ésteres de estero e TAGs, foi quantificada por gravimetria, e correspondia a 79,38% e 94,50% do óleo de

Canas de Senhorim e de Oliveira de Barreiros, respetivamente (Tabela 15). A quantidade de lípidos de polaridade intermédia foi estimada através do cálculo da diferença da fração de lípidos neutros e da fração de lípidos polares ao extrato total, obtendo-se uma percentagem de 18,10% e 3,26% para o óleo de Canas de Senhorim e de Oliveira de Barreiros, respetivamente (Tabela 15). A quantidade de lípidos polares foi determinada por espectrofotometria, nas frações enriquecidas em lípidos polares no óleo, tendo-se obtido 2,57% e 2,24% para o óleo de sementes de azeitona de Canas de Senhorim e Oliveira de Barreiros, respetivamente (Tabela 15). Comparando os dois grupos, pode-se afirmar que o óleo de sementes de azeitona de Oliveira de Barreiros tinha mais 15% de lípidos neutros e menos 15% de lípidos de polaridade intermédia do que o óleo de Canas de Senhorim.

Tabela 15. Composição lipídica do óleo de sementes de azeitona Arbequina de duas regiões geográficas de Nelas (região do Dão, Portugal) em grupos de lípidos, consoante a sua polaridade, em percentagem

Canas de Senhorim	Oliveira de Barreiros
Lípidos neutros*	
79,38 ± 37,70	94,50 ± 7,74
Lípidos de polaridade intermédia**	
18,10 ± 37,74	3,26 ± 8,36
Lípidos polares***	
2,57 ± 0,34	2,24 ± 0,86

Os valores representam a média ± desvio padrão de cinco repetições biológicas ($n = 5$).

*Os lípidos neutros incluem ésteres de esterois e triacilgliceróis. **Os lípidos de polaridade intermédia incluem ácidos gordos livres, esteróis, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e outros. Os valores foram calculados através da diferença entre os lípidos totais (100%) e a soma dos lípidos neutros com os lípidos polares. ***Os lípidos polares incluem fosfolípidos, glicolípidos e outros. Os valores foram calculados através da soma dos teores de fosfolípidos e glicolípidos determinados por espectrofotometria, conforme indicado na Tabela 11.

3.8. Perfil de triacilgliceróis

A fração rica em lípidos neutros do óleo de sementes de azeitona, que é composta principalmente por TAGs, foi obtida por SPE do extrato lipídico total por eluição com clorofórmio. Esta fração foi analisada por ESI-Q-ToF-MS com injeção direta. Pode-se observar, na Figura 12, o espectro de ESI-MS da fração de TAGs do óleo de sementes de azeitona Arbequina. No espectro podem-se identificar os íons correspondentes às espécies moleculares de TAGs como aductos de amónio (íons $[M+NH_4]^+$) na região de m/z 840-940.

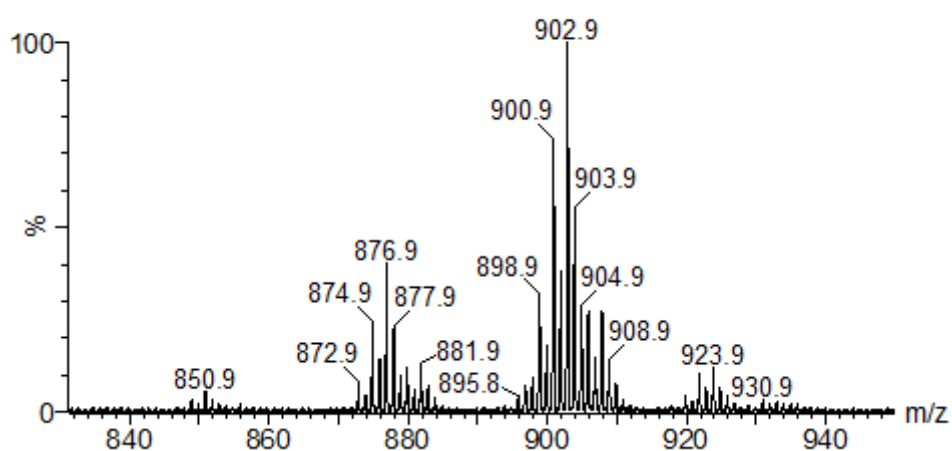


Figura 12. Espectro de ESI-MS de triacilgliceróis (TAGs), presentes no óleo de sementes de azeitona, após a análise da fração obtida por extração em fase sólida enriquecida em lípidos neutros, em que os TAGs se observam como íons $[M+NH_4]^+$.

Nas sementes de azeitona, a maioria dos FAs estão esterificados em glicerol nos TAGs. A análise dos espectros de MS/MS dos íons de TAGs como $[M+NH_4]^+$ permitiu identificar doze íons diferentes no óleo de sementes de azeitona, e um total de trinta e três espécies moleculares (Tabela 16).

Tabela 16. Espécies moleculares de triacilgliceróis identificadas por ESI-Q-ToF-MS/MS como aductos de $[M+NH_4]^+$

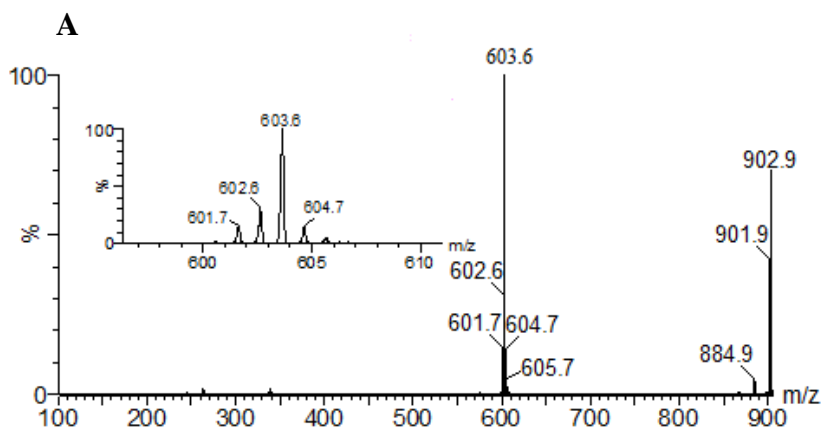
TAG	m/z $[M+NH_4]^+$	C:N	Cadeias acil
PPL, PPOO, OOM, MPC _{20:2} , MSL, C _{15:0} C _{15:0} C _{20:2} , C _{15:0} C _{17:0} L	848.9	50:2	16:0-16:0-18:2 e 16:0-16:1-18:1 e 18:1-18:1-14:0 e 14:0-16:0-20:2 e 14:0-18:0-18:2 e 15:0-15:0- 20:2 e 15:0-17:0-18:2
PPO, PPOs, C _{15:0} C _{17:0} O, C _{17:0} C _{17:0} Po	850.9	50:1	16:0-16:0-18:1 e 16:0-16:1-18:0 e 15:0-17:0-18:1 e 17:0-17:0-16:1
POLn, PoLL, PoOL	872.9	52:4	16:0-18:1-18:3 e 16:0-18:2-18:2 e 16:1-18:1-18:2
POL, PoSL, PoOO	874.9	52:3	16:0-18:1-18:2 e 16:1-18:0-18:2 e 16:1-18:1-18:1
POO, PLS	876.9	52:2	16:0-18:1-18:1 e 16:0-18:2-18:0
PSO	878.9	52:1	16:0-18:0-18:1
OLL, OOLn	898.9	54:5	18:1-18:2-18:2 e 18:1-18:1-18:3
OOL, SLL, SOLn	900.9	54:4	18:1-18:1-18:2 e 18:0-18:2-18:2 e 18:0-18:1-18:3
OOO, SOL	902.9	54:3	18:1-18:1-18:1 e 18:0-18:1-18:2
SOO, SSL	904.9	54:2	18:0-18:1-18:1 e 18:0-18:0-18:2
SSO, POA, MSE	906.9	54:1	18:0-18:0-18:1 e 16:0-18:1-20:0 e 14:0-18:0-22:1
SSS	908.9	54:0	18:0-18:0-18:0

Os valores representam a média \pm desvio padrão de cinco repetições biológicas ($n = 5$). Abreviaturas: M, ácido mirístico, C_{14:0}; ácido pentadecanóico, C_{15:0}; P, ácido palmítico, C_{16:0}; Po, ácido palmitoleico, C_{16:1}; ácido heptadecanóico, C_{17:0}; S, ácido esteárico, C_{18:0}; O, ácido oleico, C_{18:1}; L, ácido linoleico, C_{18:2}; Ln, ácido linolénico, C_{18:3}; A, ácido araquídico, C_{20:0}; ácido di-homo-linoleico, C_{20:2}; E, ácido erúxico; C_{22:1}; C:N, número de carbonos:número de ligações duplas.

Os iões mais abundantes foram encontrados a m/z 902.9, e identificado como TAG(54:3), m/z 876.9, TAG(52:2) e m/z 900.9, TAG(54:4), que correspondem ao 1,2,3-tri-oleoil-glicerol (OOO), ao di-oleoil-palmitoilglicerol (OOP) e ao di-oleoil-linoleoilglicerol (OOL), respetivamente. Estes TAGs contêm nas suas cadeias acil os FAs maioritários do óleo de sementes de azeitona, como o 18:1, o 16:0 e o 18:2. Para além destes, foram identificados outros TAGs, na forma de iões $[M+NH_4]^+$, tais como m/z 848.9, TAG(50:2), m/z 850.9, TAG(50:1), m/z 872.9, TAG(52:4), m/z 874.9, TAG(52:3), m/z 878.9, TAG(52:1), m/z 898.9, TAG(54:5), m/z 904.9, TAG(54:2), m/z 906.9, TAG(54:1), m/z 908.9, TAG(54:0), contendo FAs minoritários tais como o 14:0, 15:0, 16:1, 17:0, 18:0, 20:2 e o 22:1.

Os iões $[M+NH_4]^+$ têm um padrão de fragmentação característico em MS/MS e a análise desses espectros permitiu inferir a composição das cadeias acil dos TAGs. Os espectros mostraram uma perda neutra típica de 17 Da, que correspondia à perda neutra

de amônia (-NH₃) e a perda neutra de cada cadeia acil como ácido carboxílico livre mais amônia neutra (RCOOH+NH₃), originando um ou mais íões do tipo DAG, dependendo da composição das cadeias acil. Na Figura 13A, está representado o espectro de MS/MS do íão de *m/z* 902.9. Neste espectro observam-se três íões fragmentos diferentes, dos quais se destaca o íão de *m/z* 603.6 como o mais abundante. O íão fragmento de *m/z* 603.6 corresponde à perda combinada de ácido oleico com NH₃ ([M+NH₄-NH₃-C18:1]⁺), o 601.7 à perda de ácido esteárico ([M+NH₄-NH₃-C18:0]⁺) e o 605.7 representa a perda do ácido linoleico ([M+NH₄-NH₃-C18:2]⁺). Na Figura 13B, está representado o espectro de MS/MS do íão de *m/z* 876.9. Observam-se dois íões fragmentos diferentes, dos quais se destaca o íão de *m/z* 577.6 como o mais abundante. O íão fragmento de *m/z* 577.6 corresponde à perda de ácido palmítico ([M+NH₄-NH₃-C16:0]⁺) e o 603.6 representa a perda do ácido oleico ([M+NH₄-NH₃-C18:1]⁺). Na Figura 13C, está representado o espectro de MS/MS do íão de *m/z* 900.9. Observam-se dois íões fragmentos diferentes, dos quais se destaca o íão de *m/z* 601.6 como o mais abundante. O íão fragmento de *m/z* 601.6 corresponde à perda de ácido esteárico ([M+NH₄-NH₃-C18:0]⁺) e o 603.7 representa a perda do ácido oleico ([M+NH₄-NH₃-C18:1]⁺).



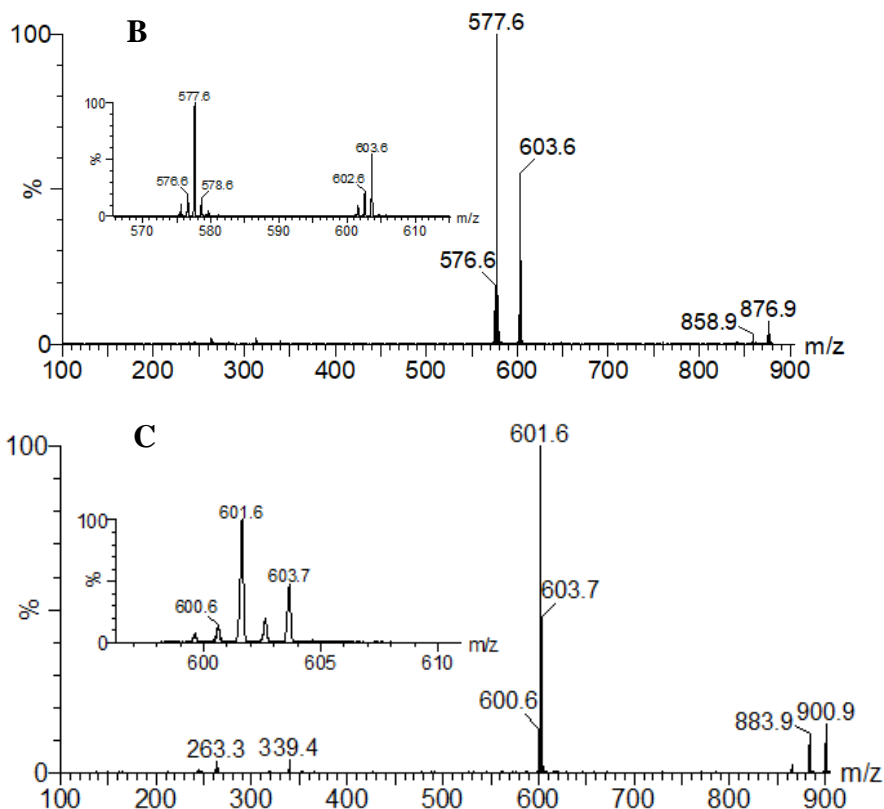


Figura 13. Espectros de ESI-MS/MS de TAGs como iões $[M+NH_4]^+$: (A) com m/z 902.9, correspondente ao TAG(54:3), (B) com m/z 876.9, correspondente ao TAG (52:2) e (C) com m/z 900.9, correspondente ao TAG(54:4), obtidos após a análise da fração de lípidos neutros obtida por extração em fase sólida.

3.9. Perfil de lípidos polares

3.9.1. Quantificação de fosfolípidos e glicolípidos nas frações enriquecidas

A fração enriquecida em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona, que é composta principalmente por PLs e GLs, foi obtida por SPE. Verificou-se que, após o fracionamento do óleo, a quantidade de GLs obtida era o triplo da quantidade de PLs (Tabela 17). Além disso, a percentagem de recuperação de PLs e de GLs foi superior a 90% em ambos os casos.

Tabela 17. Quantidade de fosfolípidos e de glicolípidos no óleo de sementes de azeitona e percentagem de recuperação após fracionamento por extração em fase sólida

	Fosfolípidos	Glicolípidos
Percentagem no óleo (%)	0,68 ± 0,12	1,89 ± 0,35
Quantidade aplicada na coluna de extração (µg em ca. 8 mg de óleo)	54,25	150,56
Quantidade obtida após fracionamento (µg)	51,92 ± 27,90	137,66 ± 83,13
Percentagem de recuperação (%)	95,71	91,43

Os valores representam a média ± desvio padrão de cinco repetições biológicas ($n = 5$).

3.9.2. Análise qualitativa dos lípidos polares por cromatografia em camada fina

De modo a determinar quais as classes de PLs e GLs presentes na fração enriquecida em lípidos polares obtida por SPE, foi realizado uma TLC. Na placa de cromatografia foram aplicados padrões de várias classes de lípidos polares conhecidas para comparação com as bandas obtidas após separação.

Após a revelação da placa (Figura 14), observaram-se treze bandas de lípidos polares no óleo de sementes de azeitona. Relativamente a PLs, verificou-se a separação de quatro bandas (bandas 1, 3, 4 e 9, Figura 14) ao nível dos padrões de LPC, PC, PI e PA, respetivamente. Em termos de GLs, observou-se uma banda ao nível do padrão de DGDG (banda 2, Figura 14) e outra banda ao nível do padrão de MGDG (banda 5, Figura 14). Verificou-se também que as bandas 6 e 7 correspondiam à eluição de duas classes de lípidos polares que co-eluíam, isto é, a banda 6 migrou ao nível dos padrões de PG e DGTS e a banda 7 ao nível dos padrões de PE e SQDG. Para além destas bandas, foi possível visualizar uma banda ao nível do padrão de ASG (banda 11, Figura 14) e quatro outras bandas (bandas 8, 10, 12 e 13, Figura 14) que poderão ser outros lípidos não identificados. Estas bandas poderão corresponder a lípidos mais apolares que tenham eluído nesta fração, uma vez que a banda 14 coincide com o padrão de trioleína (OOO).

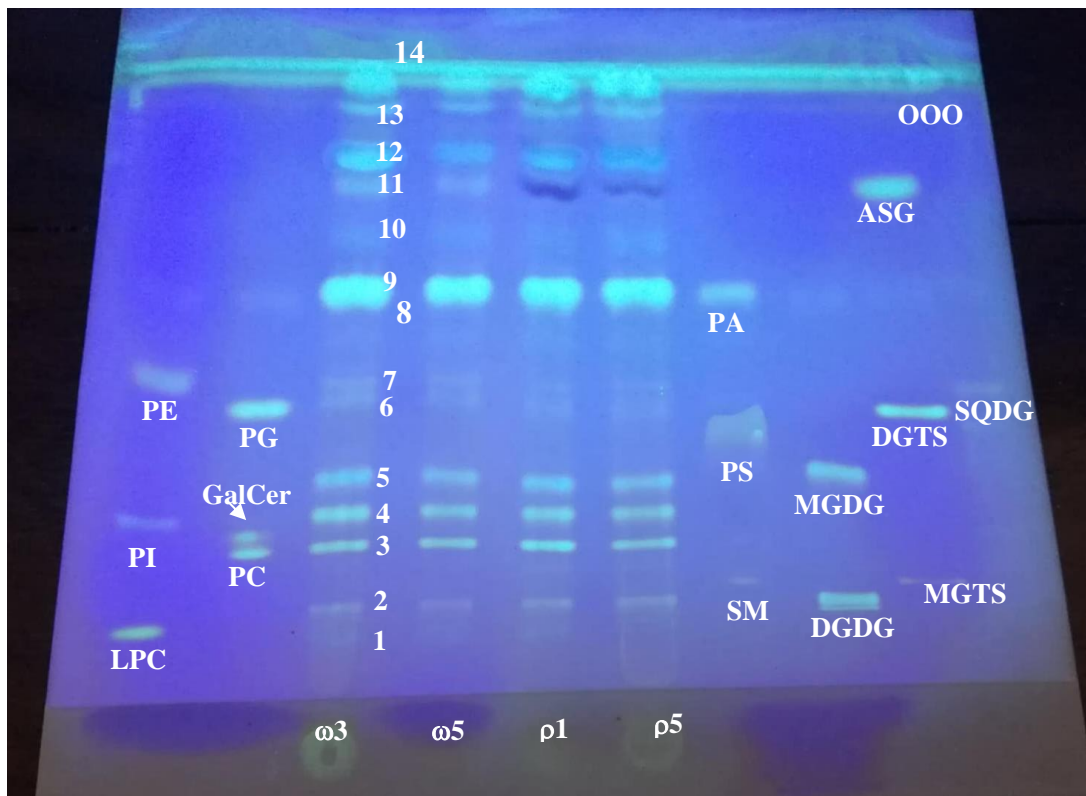


Figura 14. Cromatografia em camada fina da fração de lípidos polares do óleo de sementes de azeitona Arbequina, de duas regiões geográficas de Nelas, de quatro réplicas biológicas ($\omega 3$ e $\omega 5$, relativas a Canas de Senhorim; e $\rho 1$ e $\rho 5$, relativas a Oliveira de Barreiros), obtida após extração em fase sólida.

3.9.3. Quantificação de fosfolípidos e glicolípidos nas bandas obtidas após cromatografia em camada fina

Após a TLC da fração enriquecida em lípidos polares, procedeu-se à quantificação de PLs e GLs nas bandas correspondentes a estas famílias de lípidos (Tabela 18). Relativamente aos PLs, foi possível separar seis classes destes compostos. As classes mais abundantes eram PA (73,75%), PI (9,57%), e PC (7,43%), seguidas de PG (2,10%), LPC (1,56%) e PE (0,25%). Em termos de GLs, os DGDG correspondiam a 21,64% e os MGDG a 19,90% do total de GLs. Verificou-se que os ASG correspondiam a 22,57% das classes lipídicas que contêm uma porção de açúcar. As bandas não identificadas, 8 e 10, quantificaram PLs e GLs.

Tabela 18. Percentagem de cada classe de fosfolípido e de glicolípido ou glucósido no óleo de sementes de azeitona Arbequina obtida após a quantificação de fósforo e de glucose nas respetivas bandas separadas por cromatografia em camada fina do extrato de lípidos polares recuperado por extração em fase sólida

Classe de fosfolípido	Banda	% da classe relativa ao total de lípidos polares com fósforo	Classe de glicolípido ou glucósido	Banda	% da classe relativa ao total de lípidos polares com glucose
LPC	1	1,56 ± 1,07	DGDG	2	21,64 ± 9,08
PC	3	7,43 ± 2,37	MGDG	5	19,90 ± 6,70
PI	4	9,57 ± 3,04			
PG	6	2,10 ± 0,80	ASG	11	22,57 ± 11,33
PE	7	0,25 ± 0,90			
Desconhecida	8	6,43 ± 4,35	Desconhecida	8	33,32 ± 4,16
PA	9	73,75 ± 3,21			
Desconhecida	10	4,24 ± 0,27	Desconhecida	10	22,01 ± 2,41
Soma		105,33 ± 16,00			119,44 ± 33,69

Os valores representam a média ± desvio padrão de cinco repetições biológicas ($n = 4$).

Com base nos resultados obtidos na Tabela 18 e sabendo o total de PLs e GLs no óleo de sementes de azeitona representado na Tabela 11, foi possível calcular a massa em Kg e a percentagem de cada classe no óleo (Tabela 19).

Tabela 19. Massa e percentagem de cada classe de fosfolípido e de glicolípido ou glucósido no óleo de sementes de azeitona Arbequina

Classe de fosfolípido	Massa em g Kg ⁻¹ de cada classe no óleo	% de cada classe no óleo	Classe de glicolípido ou glucósido	Massa em g Kg ⁻¹ de cada classe no óleo	% de cada classe no óleo
LPC	0,10 ± 0,08	0,01 ± 0,01	DGDG	3,42 ± 0,94	0,34 ± 0,09
PC	0,48 ± 0,18	0,05 ± 0,02	MGDG	3,15 ± 0,70	0,31 ± 0,07
PI	0,62 ± 0,23	0,06 ± 0,02			
PG	0,01 ± 0,06	0,01 ± 0,01	ASG	3,57 ± 1,18	0,36 ± 0,12
PE	0,02 ± 0,07	0,01 ± 0,01			
Banda 8	0,42 ± 0,33	0,04 ± 0,03	Banda 8	5,27 ± 0,43	0,53 ± 0,04
PA	4,76 ± 0,24	0,48 ± 0,02			
Banda 10	0,27 ± 0,02	0,03 ± 0,01	Banda 10	3,48 ± 0,25	0,35 ± 0,03
Soma	6,68 ± 1,21	0,69 ± 0,13		18,89 ± 3,50	1,89 ± 0,35

3.9.4. Identificação e quantificação relativa dos lípidos polares por HPLC-ESI-MS/MS

A fração enriquecida em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona, obtida por SPE, foi analisada por HILIC-ESI-MS/MS de alta resolução. Conforme descrito anteriormente, a identificação das espécies moleculares dos lípidos polares foi baseada na sua massa exata (erro ≤ 5 ppm), no seu tempo de retenção e na análise dos espectros de MS/MS de cada ião. O cromatograma de corrente iônica total no modo de ionização positiva (Figura 15A) e no modo de ionização negativa (Figura 15B) mostrou a eluição das classes lipídicas com diferentes tempos de retenção. Foram identificadas dezoito classes de lípidos polares, incluindo PLs, GLs, ASGs e esfingolípido (Figura 15). No total foram identificadas cento e vinte e nove espécies moleculares: setenta e sete correspondendo a PLs, trinta e três a GLs, quatro a ASGs derivados de sitosterol e quinze a esfingolípido (Tabela 20).

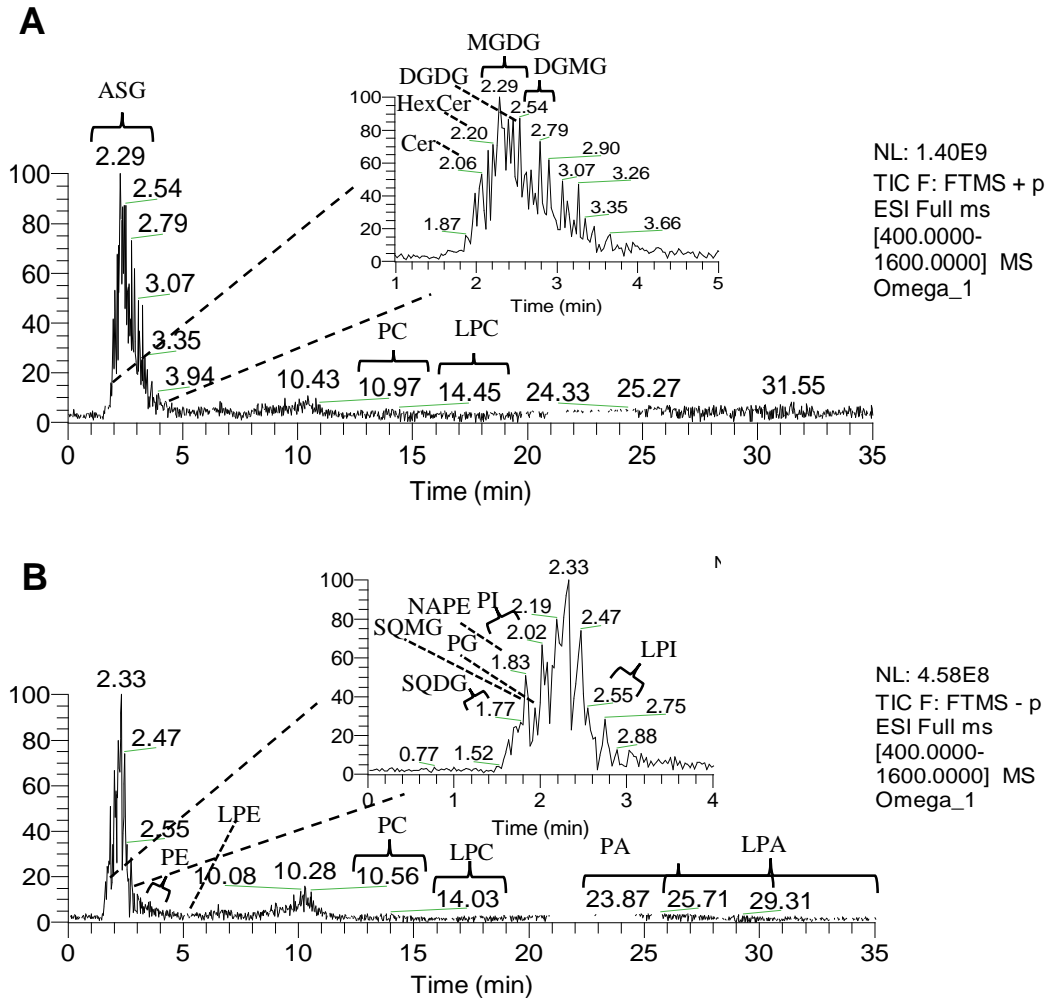


Figura 15. Cromatogramas de corrente iônica total da fração enriquecida em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona Arbequina nos modos de ionização positiva (A) e negativa (B) obtidos por HILIC-ESI-MS.

Tabela 20. Espécies moleculares de lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos, esteróis glicosilados acilados e esfingolípidos) identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina por HILIC-ESI-MS e HILIC-ESI-MS/MS

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M+H] ⁺				
PC(32:2)*	C ₄₀ H ₇₇ NO ₈ P	730,5364	730,5387	-3,1	11,68	
PC(32:0)*	C ₄₀ H ₈₁ NO ₈ P	734,5712	734,5700	1,7	11,47	
PC(33:2)	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744,5535	744,5543	-1,1	10,95	16:0-17:2 e 18:2-15:0
PC(33:1)	C ₄₂ H ₈₅ NO ₇ P	746,6038	746,6064	-3,4	10,56	18:1-15:0 e 16:0-17:1
PC(34:4)*	C ₄₂ H ₇₇ NO ₈ P	754,5373	754,5387	-1,8	11,19	
PC(34:3)*	C ₄₂ H ₇₉ NO ₈ P	756,5541	756,5543	-0,3	11,45	
PC(34:2)	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈ P	758,5706	758,5700	0,8	10,56	18:2-16:0
PC(34:1)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₈ P	760,5861	760,5856	0,6	10,56	16:0-18:1
PC(35:3)	C ₄₃ H ₈₁ NO ₈ P	770,5693	770,5700	-0,9	10,80	18:2-17:1 e 18:1-17:2
PC(35:2)	C ₄₃ H ₈₃ NO ₈ P	772,5836	772,5856	-2,6	10,48	18:2-17:0 e 18:1-17:1
PC(35:1)*	C ₄₃ H ₈₅ NO ₈ P	774,6015	774,6013	0,3	10,56	
PC(36:6)*	C ₄₄ H ₇₇ NO ₈ P	778,5381	778,5387	-0,7	10,36	
PC(36:5)*	C ₄₄ H ₇₉ NO ₈ P	780,5527	780,5543	-2,1	10,96	
PC(36:4)	C ₄₄ H ₈₁ NO ₈ P	782,5687	782,5700	-1,6	10,80	18:2-18:2
PC(36:3)	C ₄₄ H ₈₃ NO ₈ P	784,5861	784,5856	0,6	10,56	18:1-18:2

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M+H] ⁺				
PC(36:2)	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈ P	786,6016	786,6013	0,4	10,80	18:1-18:1 e 18:2-18:0
PC(37:4)*	C ₄₅ H ₈₃ NO ₈ P	796,5831	796,5856	-3,2	10,20	
PC(36:4(OH))*	C ₄₄ H ₈₁ NO ₉ P	798,5635	798,5649	-1,7	10,80	
PC(36:3(OH))*	C ₄₄ H ₈₃ NO ₉ P	800,5809	800,5805	0,4	10,28	
PC(37:2)*	C ₄₅ H ₈₇ NO ₈ P	800,6154	800,6169	-1,9	11,17	
PC(36:2(OH))*	C ₄₄ H ₈₅ NO ₉ P	802,5955	802,5962	-0,9	10,84	
PC(38:2)*	C ₄₆ H ₈₉ NO ₈ P	814,6334	814,6326	1,0	10,11	
PC(38:4(2OH))*	C ₄₆ H ₈₅ NO ₁₀ P	842,5894	842,5911	-2,0	10,56	
		[M+H] ⁺				
LPC(14:0)*	C ₂₂ H ₄₇ NO ₇ P	468,3086	468,3090	-0,9	14,49	
LPC(16:1)*	C ₂₄ H ₄₉ NO ₇ P	494,3242	494,3247	-0,9	14,72	
LPC(16:0)	C ₂₄ H ₅₁ NO ₇ P	496,3404	496,3403	0,2	14,10	16:0
LPC(18:3)	C ₂₆ H ₄₉ NO ₇ P	518,3225	518,3247	-4,2	14,26	18:3
LPC(18:2)	C ₂₆ H ₅₁ NO ₇ P	520,3408	520,3403	0,9	14,03	18:2
LPC(18:1)	C ₂₆ H ₅₃ NO ₇ P	522,3564	522,3560	0,8	14,10	18:1
LPC(18:0)	C ₂₆ H ₅₅ NO ₇ P	524,3714	524,3716	-0,4	13,84	18:0

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M-H]⁻				
PE(32:1)*	C ₃₇ H ₇₁ NO ₈ P	688,4927	688,4917	1,4	3,99	
PE(34:3)*	C ₃₉ H ₇₃ NO ₈ P	712,4920	712,4917	0,4	4,09	
PE(34:2)*	C ₃₉ H ₇₃ NO ₈ P	714,5048	714,5074	-3,6	3,99	
PE(34:1)	C ₃₉ H ₇₅ NO ₈ P	716,5206	716,5230	-3,4	3,95	16:0-18:1 e 14:0-20:1
PE(36:3)	C ₄₁ H ₇₅ NO ₈ P	740,5216	740,5230	-1,9	3,95	18:2-18:1
PE(36:2)	C ₄₁ H ₇₇ NO ₈ P	742,5368	742,5387	-2,5	3,95	18:1-18:1
PE(36:1)*	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744,5511	744,5543	-4,3	3,93	
PE(38:2)*	C ₄₃ H ₈₁ NO ₈ P	770,5709	770,5700	1,2	3,86	
PE(38:1)*	C ₄₃ H ₈₃ NO ₈ P	772,5850	772,5856	-0,8	3,97	
		[M-H]⁻				
LPE(14:0)*	C ₁₉ H ₃₉ NO ₇ P	424,2475	424,2464	2,6	5,52	
LPE(16:0)*	C ₂₁ H ₄₃ NO ₇ P	452,2768	452,2777	-2,0	5,75	
LPE(18:2)*	C ₂₃ H ₄₃ NO ₇ P	476,2770	476,2777	-1,5	5,43	
LPE(18:1)*	C ₂₃ H ₄₅ NO ₇ P	478,2923	478,2934	-2,2	5,90	
		[M-H]⁻				
NAPE(52:4)	C ₅₇ H ₁₀₃ NO ₉ P	976,7375	976,7370	0,5	1,87	18:2-18:2-16:0 e 18:3-18:1-16:0
NAPE(52:3)	C ₅₇ H ₁₀₅ NO ₉ P	978,7535	978,7527	0,8	1,84	18:2-18:1-16:0

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M-H]⁻				
NAPE(52:2)	C ₅₇ H ₁₀₇ NO ₉ P	980,7683	980,7683	0,0	1,83	16:0-18:2-18:0
NAPE(54:6)	C ₅₉ H ₁₀₃ NO ₉ P	1000,7375	1000,7370	0,5	1,87	18:2-18:2-18:2 e 18:1-18:2-18:3
NAPE(54:5)	C ₅₉ H ₁₀₅ NO ₉ P	1002,7488	1002,7527	-3,9	1,84	18:1-18:2-18:2
NAPE(54:4)	C ₅₉ H ₁₀₇ NO ₉ P	1004,7691	1004,7683	0,7	1,83	18:1-18:2-18:1
NAPE(54:3)	C ₅₉ H ₁₀₉ NO ₉ P	1006,7829	1006,7840	-1,1	1,87	18:2-18:1-18:0
		[M-H]⁻				
PG(32:1)*	C ₃₈ H ₇₂ O ₁₀ P	719,4863	719,4863	0,0	1,94	
PG(32:0)	C ₃₈ H ₇₄ O ₁₀ P	721,5030	721,5020	1,4	1,90	16:0-16:0
PG(34:4)*	C ₄₀ H ₇₀ O ₁₀ P	741,4706	741,4707	-0,1	1,92	
PG(34:3)*	C ₄₀ H ₇₂ O ₁₀ P	743,4866	743,4863	0,4	1,84	
PG(34:2)	C ₄₀ H ₇₄ O ₁₀ P	745,5000	745,5020	-2,6	2,02	18:2-16:0
PG(34:1)	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P	747,5158	747,5176	-2,4	2,02	18:1-16:0
PG(36:6)*	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₀ P	765,4708	765,4707	0,2	1,99	
PG(36:3)	C ₄₂ H ₇₆ O ₁₀ P	771,5149	771,5176	-3,5	2,02	18:1-18:2
PG(36:2)	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P	773,5329	773,5333	-0,5	2,02	18:1-18:1
PG(36:1)*	C ₄₂ H ₈₀ O ₁₀ P	775,5455	775,5489	-4,4	1,90	

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M-H]⁻				
PA(34:2)	C ₃₇ H ₆₈ O ₈ P	671,4637	671,4652	-2,2	24,70	16:0-18:2
PA(34:1)	C ₃₇ H ₇₀ O ₈ P	673,4789	673,4808	2,9	24,17	16:0-18:1
PA(36:4)	C ₃₉ H ₆₈ O ₈ P	695,4669	695,4652	2,5	25,00	18:2-18:2
PA(36:3)	C ₃₉ H ₇₀ O ₈ P	697,4792	697,4808	-2,3	24,83	18:1-18:2
PA(36:2)	C ₃₉ H ₇₂ O ₈ P	699,4944	699,4965	-3,0	25,97	18:1-18:1 e 18:2-18:0
PA(38:2)*	C ₄₁ H ₇₆ O ₈ P	727,5296	727,5278	2,5	24,21	
PA(38:1)*	C ₄₁ H ₇₈ O ₈ P	729,5405	729,5434	-4,0	24,84	
		[M-H]⁻				
LPA(16:0)*	C ₁₉ H ₃₈ O ₇ P	409,2358	409,2355	0,7	25,63	
		[M-H]⁻				
PI(34:3)	C ₄₃ H ₇₆ O ₁₃ P	831,5005	831,5024	-2,2	2,07	16:0-18:3
PI(34:2)	C ₄₃ H ₇₈ O ₁₃ P	833,5154	833,5180	-3,1	2,02	16:0-18:2
PI(34:1)	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	835,5313	835,5337	-2,8	2,02	16:0-18:1 e 16:1-18:0
PI(36:4)	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P	857,5196	857,5180	1,9	2,02	18:2-18:2
PI(36:3)	C ₄₅ H ₈₀ O ₁₃ P	859,5313	859,5337	-2,7	2,02	18:1-18:2
PI(36:2)	C ₄₅ H ₈₂ O ₁₃ P	861,5464	861,5493	-3,4	2,02	18:1-18:1 e 18:2-18:0
PI(36:1)	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863,5624	863,5650	-3,0	2,02	18:1-18:0

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M-H]⁻				
PI(40:3)*	C ₄₉ H ₈₈ O ₁₃ P	915,5940	915,5963	-2,5	2,06	
		[M-H]⁻				
LPI(16:0)	C ₂₅ H ₄₈ O ₁₂ P	571,2883	571,2883	-0,1	2,60	16:0
		[M-H]⁻				
SQDG(30:1)*	C ₃₉ H ₇₁ O ₁₂ S	763,4681	763,4666	1,9	1,83	
SQDG(32:1)*	C ₄₁ H ₇₅ O ₁₂ S	791,4954	791,4979	-3,2	1,74	
SQDG(32:0)*	C ₄₁ H ₇₇ O ₁₂ S	793,5132	793,5136	-0,5	1,71	
SQDG(34:3)*	C ₄₃ H ₇₅ O ₁₂ S	815,4950	815,4979	-3,6	1,83	
SQDG(34:2)*	C ₄₃ H ₇₇ O ₁₂ S	817,5110	817,5136	-3,2	1,83	
SQDG(34:1)*	C ₄₃ H ₇₉ O ₁₂ S	819,5266	819,5292	-3,2	1,83	
SQDG(36:4)	C ₄₅ H ₇₇ O ₁₂ S	841,5106	841,5136	-3,5	1,83	18:1-18:3
SQDG(36:3)*	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₂ S	843,5262	843,5292	-3,6	1,53	
SQDG(36:2)	C ₄₅ H ₈₁ O ₁₂ S	845,5421	845,5449	-3,3	1,53	18:1-18:1
SQDG(36:1)*	C ₄₅ H ₈₃ O ₁₂ S	847,5572	847,5605	-3,9	1,85	

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M-H]⁻				
SQMG(16:1)*	C ₂₅ H ₄₅ O ₁₁ S	553,2677	553,2683	-1,0	1,85	16:0
SQMG(16:0)	C ₂₅ H ₄₇ O ₁₁ S	555,2840	555,2839	0,2	1,83	
SQMG(18:1)*	C ₂₇ H ₄₉ O ₁₁ S	581,3001	581,2996	0,9	1,83	
SQMG(20:1)*	C ₂₉ H ₅₃ O ₁₁ S	609,3295	609,3309	-2,2	1,83	22:1
SQMG(22:1)	C ₃₁ H ₅₇ O ₁₁ S	637,3609	637,3622	-2,0	1,84	
SQMG(22:0)*	C ₃₁ H ₅₉ O ₁₁ S	639,3760	639,3778	-2,8	1,84	
		[M+NH₄]⁺				
MGDG(34:2)*	C ₄₃ H ₈₂ NO ₁₀	772,5935	772,5939	-0,5	2,04	
MGDG(34:1)*	C ₄₃ H ₈₄ NO ₁₀	774,6079	774,6095	-2,1	2,20	
MGDG(36:6)*	C ₄₅ H ₇₈ NO ₁₀	792,5627	792,5626	0,2	2,29	
MGDG(36:5)*	C ₄₅ H ₈₀ NO ₁₀	794,5772	794,5782	-1,3	2,31	
MGDG(36:4)	C ₄₅ H ₈₂ NO ₁₀	796,5943	796,5939	0,5	2,29	18:2-18:2 e 18:3-18:1
MGDG(36:3)	C ₄₅ H ₈₄ NO ₁₀	798,6093	798,6095	-0,3	2,29	18:1-18:2 e 22:3-14:0
MGDG(36:2)	C ₄₅ H ₈₆ NO ₁₀	800,6253	800,6252	0,2	2,29	18:1-18:1 e 18:2-18:0
MGDG(38:1)*	C ₄₇ H ₉₂ NO ₁₀	830,6721	830,6721	0,0	2,20	

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M+NH₄]⁺				
DGDG(34:3)*	C ₄₉ H ₉₀ NO ₁₅	932,6314	932,6310	0,4	2,34	
DGDG(34:2)	C ₄₉ H ₉₂ NO ₁₅	934,6441	934,6467	-2,8	2,36	18:0-16:2 e 16:0-18:2 e 18:1-16:1
DGDG(34:1)*	C ₄₉ H ₉₄ NO ₁₅	936,6631	936,6623	0,8	2,29	
DGDG(36:6)*	C ₅₁ H ₈₈ NO ₁₅	954,6161	954,6154	0,7	2,34	
DGDG(36:5)*	C ₅₁ H ₉₀ NO ₁₅	956,6307	956,6310	-0,4	2,54	
DGDG(36:4)	C ₅₁ H ₉₂ NO ₁₅	958,6448	958,6467	-2,0	2,40	18:3-18:1 e 20:2-16:2 e 18:2-18:2
DGDG(36:3)	C ₅₁ H ₉₄ NO ₁₅	960,6628	960,6623	0,5	2,31	18:2-18:1 e 20:1-16:2
DGDG(36:2)	C ₅₁ H ₉₆ NO ₁₅	962,6777	962,6780	-0,3	2,29	20:0-16:2 e 18:2-18:0 e 18:1-18:1
		[M+NH₄]⁺				
DGMG(18:1)*	C ₃₃ H ₆₄ NO ₁₄	698,4329	698,4327	0,3	2,45	
		[M+NH₄]⁺				
ASG(16:0-Glc-Sitosterol)	C ₅₁ H ₉₄ O ₇ N	832,703	832,7030	0,0	2,31	16:0
ASG(18:2-Glc-Sitosterol)	C ₅₃ H ₉₄ O ₇ N	856,7028	856,7030	-0,3	2,29	18:2
ASG(18:1-Glc-Sitosterol)	C ₅₃ H ₉₆ O ₇ N	858,7187	858,7187	0,0	2,15	18:1
ASG(20:0-Glc-Sitosterol)	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₇ N	888,7642	888,7656	-1,6	2,20	20:0

Tabela 20. (Continuação)

Nome do lípido	Fórmula	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> teórico	Erro de massa (ppm)	<i>t_R</i> (min)	Composição das cadeias acil
Classe (C:N)		[M+H] ⁺				
HexCer(d34:2)	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈	698,5555	698,5571	-2,3	1,98	d18:2-16:0
HexCer(d34:2(OH))	C ₄₀ H ₇₆ NO ₉	714,5526	714,5520	0,8	2,31	d18:2-16:0-OH
HexCerCer(d37:2)*	C ₄₃ H ₈₂ NO ₈	740,6045	740,6040	0,6	2,15	
HexCer(t40:1(OH))	C ₄₆ H ₉₀ NO ₁₀	816,6570	816,6565	0,6	2,29	t18:1-22:0(OH)
HexCer(t42:2)	C ₄₈ H ₉₂ NO ₉	826,6772	826,6772	0,0	2,20	t18:1-24:1
HexCer(t42:1)	C ₄₈ H ₉₄ NO ₉	828,6908	828,6929	-2,5	2,15	t18:1-24:0
HexCer(t42:1(OH))	C ₄₈ H ₉₄ NO ₁₀	844,6874	844,6878	-0,4	2,31	t18:1-24:0(OH)
HexCer(t44:1(OH))	C ₅₀ H ₉₇ NO ₁₀	872,7181	872,7191	-1,1	2,31	t18:1-26:0(OH)
		[M+H] ⁺				
Cer(t40:1(OH))	C ₄₀ H ₈₀ NO ₅	654,6037	654,6036	-0,1	2,24	t18:1/22:0(OH)
Cer(t40:0(OH))*	C ₄₀ H ₈₂ NO ₅	656,6177	656,6193	0,1	2,09	
Cer(t42:2)*	C ₄₂ H ₈₂ NO ₄	664,6246	664,6244	0,3	2,15	
Cer(t41:1(OH))	C ₄₁ H ₈₂ NO ₅	668,6179	668,6193	-2,1	2,00	t18:0-23:1(OH)
Cer(t41:0(OH))	C ₄₁ H ₈₄ NO ₅	670,6360	670,6349	1,6	2,29	t18:0-23:0(OH)
Cer(t42:1(OH))	C ₄₂ H ₈₄ NO ₅	682,6346	682,6349	-0,5	2,14	t18:1-24:0(OH)
Cer(t43:1(OH))	C ₄₃ H ₈₆ NO ₅	696,6518	696,6506	1,7	2,20	t18:1-25:0(OH)

Todas as espécies moleculares foram identificadas por MS/MS, massa exata e tempo de retenção, exceto as espécies moleculares com um asterisco (*) que foram identificadas apenas pela massa exata e pelo tempo de retenção. As cadeias acil dessas espécies não foram identificadas por MS/MS, uma vez que não foi possível adquirir o espectro informativo no modo negativo. *t_R*, tempo de retenção.

3.9.4.1. Glicerofosfolípidos

Foram identificadas dez classes de PLs, compreendendo setenta e sete espécies moleculares: PC (vinte e três espécies moleculares), LPC (sete espécies moleculares), PE (nove espécies moleculares), LPE (quatro espécies moleculares), NAPE (sete espécies moleculares), PG (dez espécies moleculares), PA (sete espécies moleculares), LPA (uma espécie molecular), PI (oito espécies moleculares) e LPI (uma espécie molecular), conforme mostrado na Tabela 20. As espécies moleculares de PC, LPC, PE, LPE e NAPE foram identificadas no modo de ionização positiva, como iões $[M+H]^+$. No modo de ionização negativa, as PC e LPC foram identificadas como iões $[M+CH_3COO]^-$ e as PE, LPE, NAPE, os PG, PA, LPA, PI e LPI foram identificados como iões $[M-H]^-$. Os iões mais abundantes nas classes de PC, LPC, PE, NAPE, PG, PA e PI foram encontrados a m/z 786.6015, m/z 522.3562, m/z 740.4936, m/z 1004.7684, m/z 747.5187, m/z 699.4980 e m/z 835.3548, e correspondiam à PC(36:2), LPC(18:1), PE(36:3), NAPE(54:4), PG(34:1), PA(36:2) e PI(34:1), respectivamente (Figura 16).

No modo de ionização positiva, nos espectros de MS/MS de PC (Figura 17A) e LPC (Figura 17B), como iões $[M+H]^+$, foi possível identificar o ião produto a m/z 184.07, que corresponde ao grupo cabeça (colina) com o fosfato (fosfocolina, $C_5H_{15}NO_4P^+$), e que é típico destas classes lipídicas. No caso dos espectros de MS/MS das PE como iões $[M+H]^+$ (Figura 17C), verificou-se a presença do ião correspondente à perda neutra do grupo cabeça (etanolamina) com o fosfato (fosfoetanolamina, $C_2H_8NO_4P$, $[M+H-141]^+$).

No modo de ionização negativa, nos espectros de MS/MS de PE (D), NAPE (E), PG (F), PA(G), LPA (H) e PI(I), como iões $[M-H]^-$, ilustrados na Figura 18, foi possível identificar a composição das cadeias acil pela presença dos FAs na forma de aniões carboxilato ($RCOO^-$), que também foram confirmados pela massa exata. No caso dos espectros de MS/MS dos iões $[M-H]^-$ para os iões de PA, LPA, PG e PI foi possível identificar o ião produto a m/z 152.99, que corresponde ao anião glicerofosfato cíclico desidratado $[C_3H_5O_6P-H_2O]^-$, e é típico das classes de gliceroPLs. Nos espectros de MS/MS destas classes, como também se observaram iões fragmentos correspondentes às perdas neutras dos FAs na forma de ácido carboxílico ($RCOO^-$) e, em alguns casos, na forma de ceteno ($RCHC=C=O^-$). No caso dos iões de PG, foi possível identificar o ião produto a m/z 171.1, correspondente ao anião glicerol fosfato ($C_3H_8O_6P^-$),

característico desta classe lipídica (Figura 18F). No caso dos iões de PI, foi possível identificar o ião produto a m/z 241.01, correspondente ao inositol fosfato cíclico ($C_6H_{10}O_8P^-$), também característico desta classe lipídica (Figura 18I).

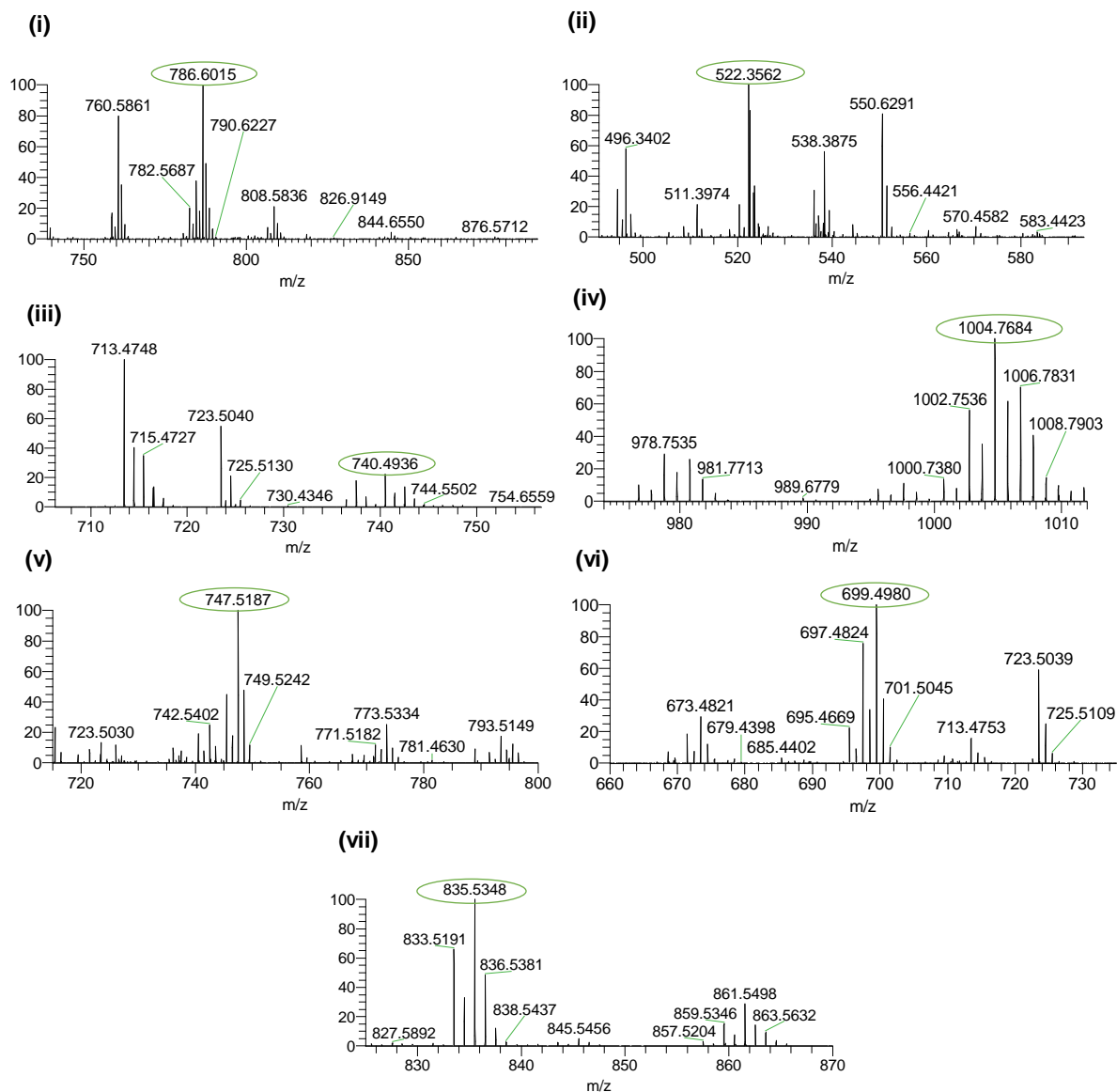


Figura 16. Espectros de LC-MS das diferentes classes de glicerofosfolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina no modo de ionização positiva para (i) PC, (ii) LPC, (iii) PE, (iv) NAPE, e no modo de ionização negativa para (v) PG, (vi) PA, e (vii) PI.

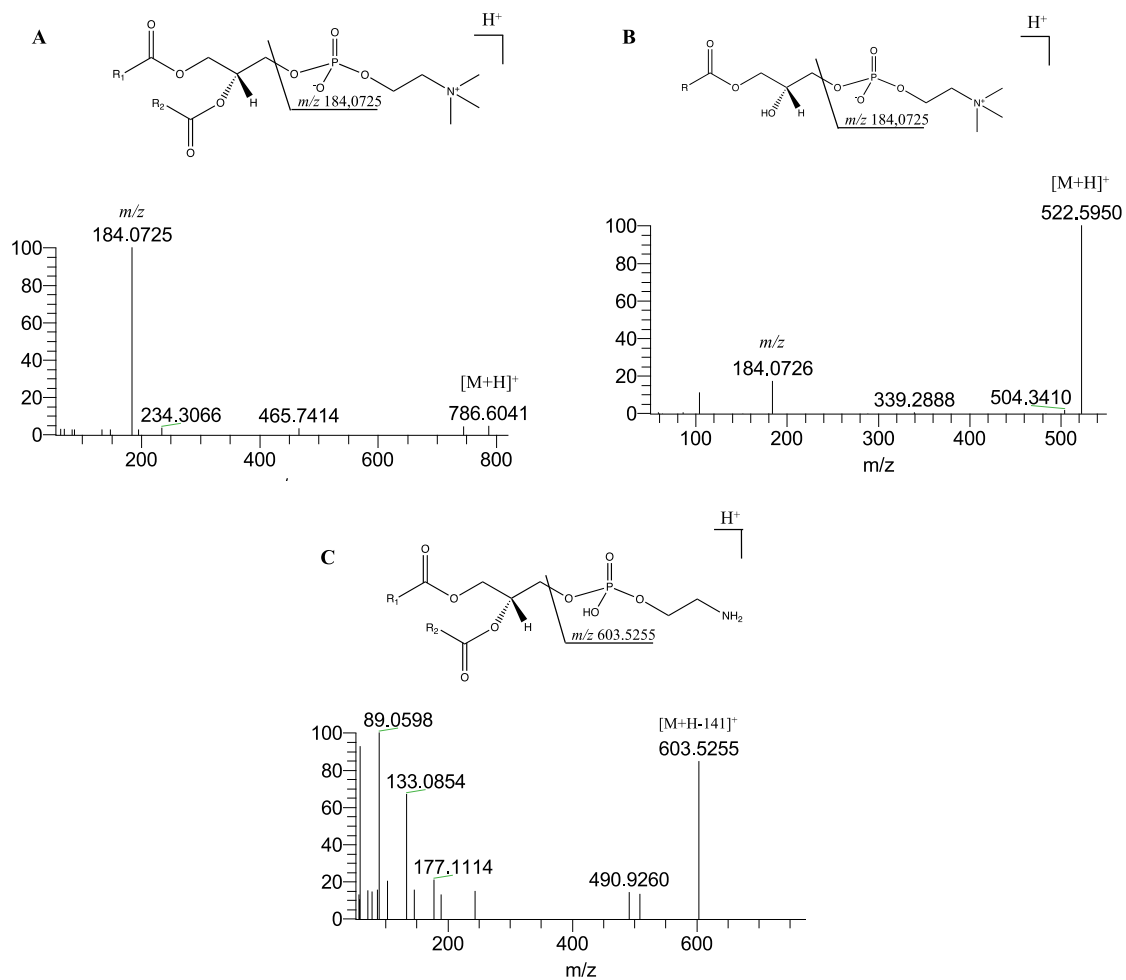
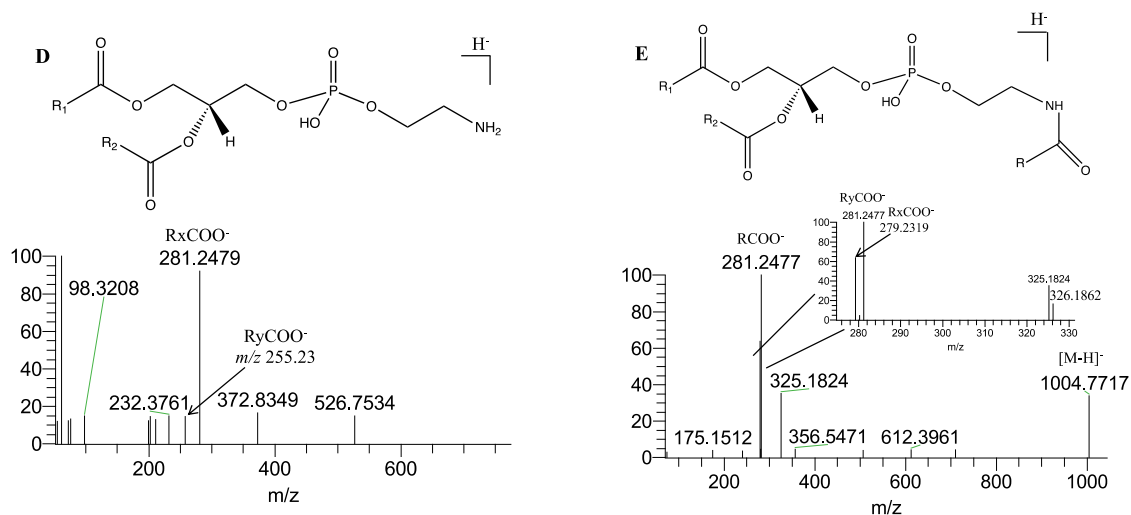


Figura 17. Espectros de LC-MS/MS das diferentes classes de glicerofosfolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina, no modo de ionização positivo, com a estrutura molecular representativa de cada classe lipídica. (A) PC(36:2) a m/z 786.6041 como $[M+H]^+$; (B) LPC(18:1) a m/z 522.5950 como $[M+H]^+$ e (C) PE(36:2) a m/z 744.5544 como $[M+H]^+$.



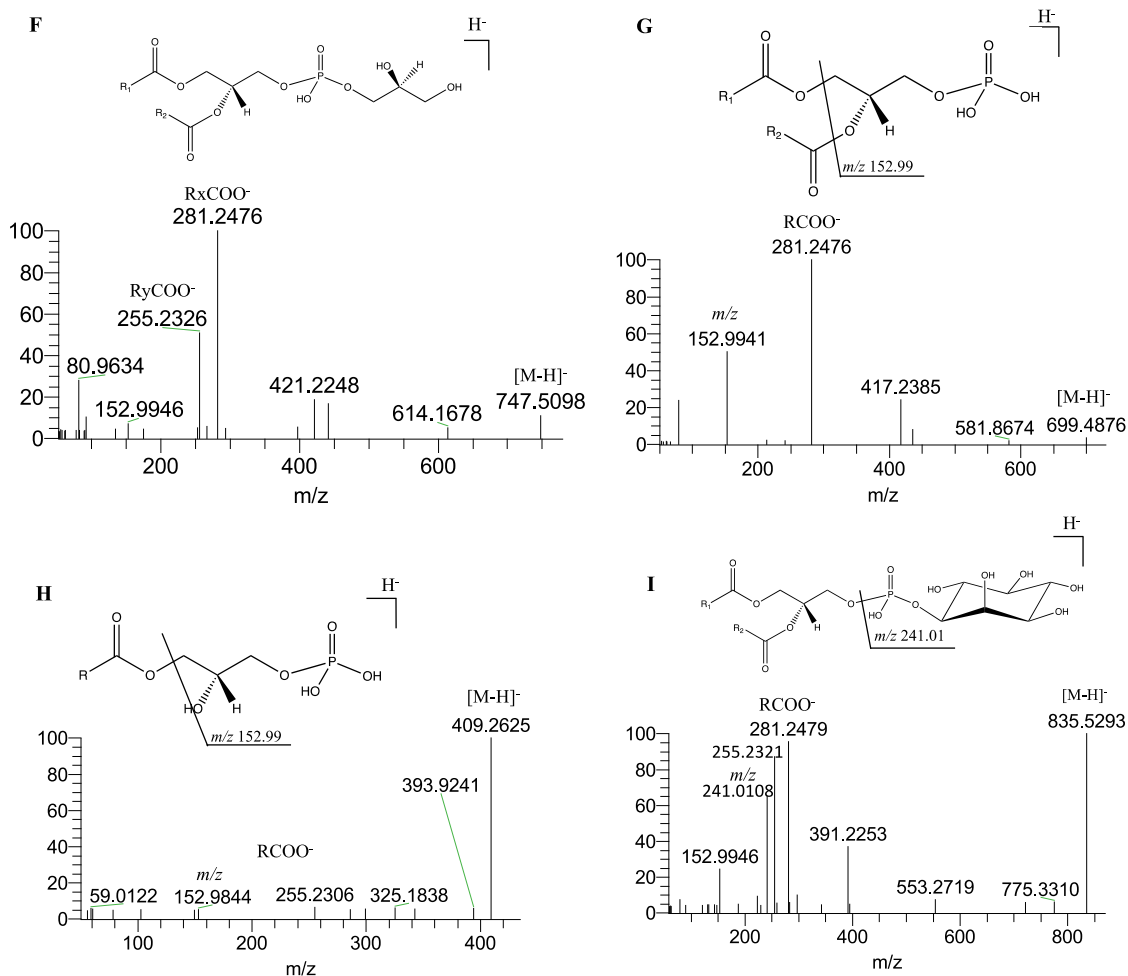


Figura 18. Espectros de LC-MS/MS das diferentes classes de glicerofosfolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina, no modo de ionização negativa, como $[M-H]^-$, com uma estrutura molecular representativa de cada classe lipídica. (D) PE(36:2) a m/z 742.5368; (E) NAPE(54:4) a m/z 1004.7717; (F) PG(34:1) a m/z 747.5098; (G) PA(36:2) a m/z 699.4980; (H) LPA(16:0) a m/z 409.2625 e (I) PI(34:1) a m/z 835.5293.

3.9.4.2. Gliceroglicolípidos

Foram identificadas cinco classes de gliceroGLs no óleo de sementes de azeitona, compreendendo a trinta e três espécies moleculares: SQDG (dez espécies moleculares), SQMG (seis espécies moleculares), MGDG (oito espécies moleculares), DGDG (oito espécies moleculares) e DGMG (uma espécie molecular), como representado na Tabela 20. Os GLs das classes SQDG e SQMG foram detetados no modo de ionização negativa como iões $[M-H]^-$. Por outro lado, os GLs das classes MGDG, DGDG e DGMG foram detetados no modo de ionização positiva como

$[M+NH_4]^+$. Os iões mais abundantes para SQDG (viii), MGDG (ix) e DGDG (x) foram detetados a m/z 845.5456, m/z 800.6253, e m/z 962.6777, correspondendo a SQDG(36:2), MGDG(36:2) e DGDG(36:2), respetivamente (Figura 19).

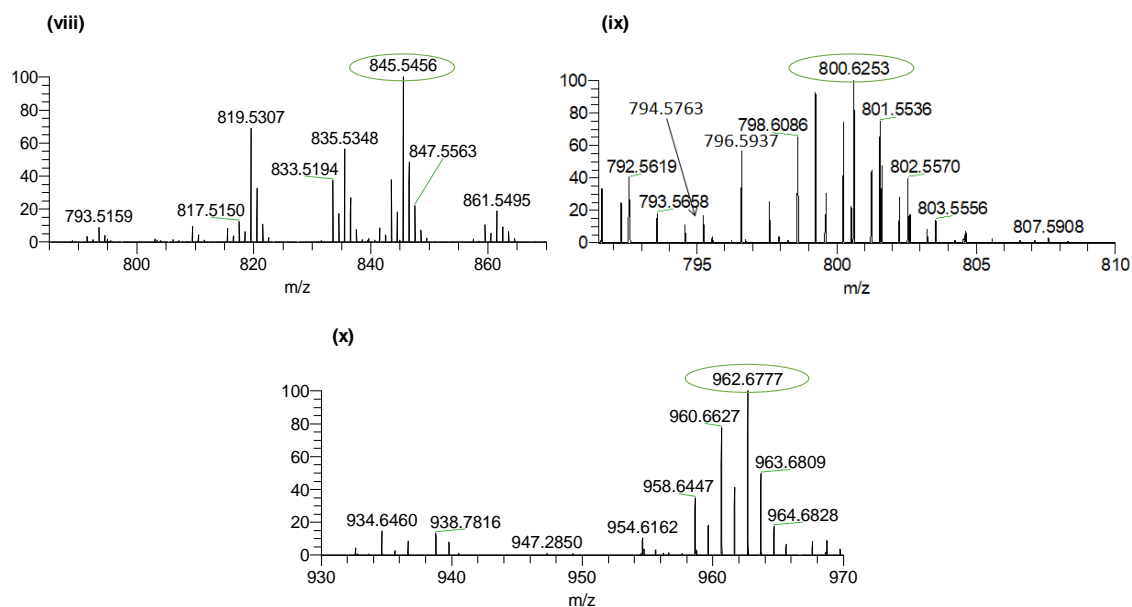


Figura 19. Espetros de LC-MS das diferentes classes de gliceroglicolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina. (viii) SQDG, no modo de ionização negativa, e (ix) MGDG e (x) DGDG no modo de ionização positiva.

Nos espetros de MS/MS dos iões $[M-H]^-$ de SQDG, foi possível identificar o ião produto de m/z 225.01, que corresponde ao grupo cabeça sulfoquinovosil ($C_6H_9O_4SO_3^-$) (Figura 20J). Também foi possível identificar as cadeias acil destas moléculas pela perda neutra dos FAs, a partir do ião precursor, na forma de ácido carboxílico ($RCOO^-$). Nos espetros de MS/MS dos iões $[M+NH_4]^+$, dos DGDG, foi possível identificar o ião produto formado pela perda neutra típica desta classe lipídica, correspondendo à perda combinada de duas hexoses (perda de 162 Da + 180 Da) com a perda de NH_3 (-17 Da), como $[M+NH_4-359]^+$ (Figura 20K). Da mesma forma, os espetros de MS/MS dos iões $[M+NH_4]^+$, dos MGDG mostraram o ião produto típico desta classe, resultante da perda combinada de uma hexose (-180 Da) com NH_3 (-17 Da), atribuída como $[M+NH_4-197]^+$ (Figura 20L). Os iões acilo característicos + 74 Da ($[RCO+74]^+$), formados através da perda combinada de um FA e da porção de hexose, permitiram a identificação da composição das cadeias acil das espécies moleculares de MGDG e DGDG.

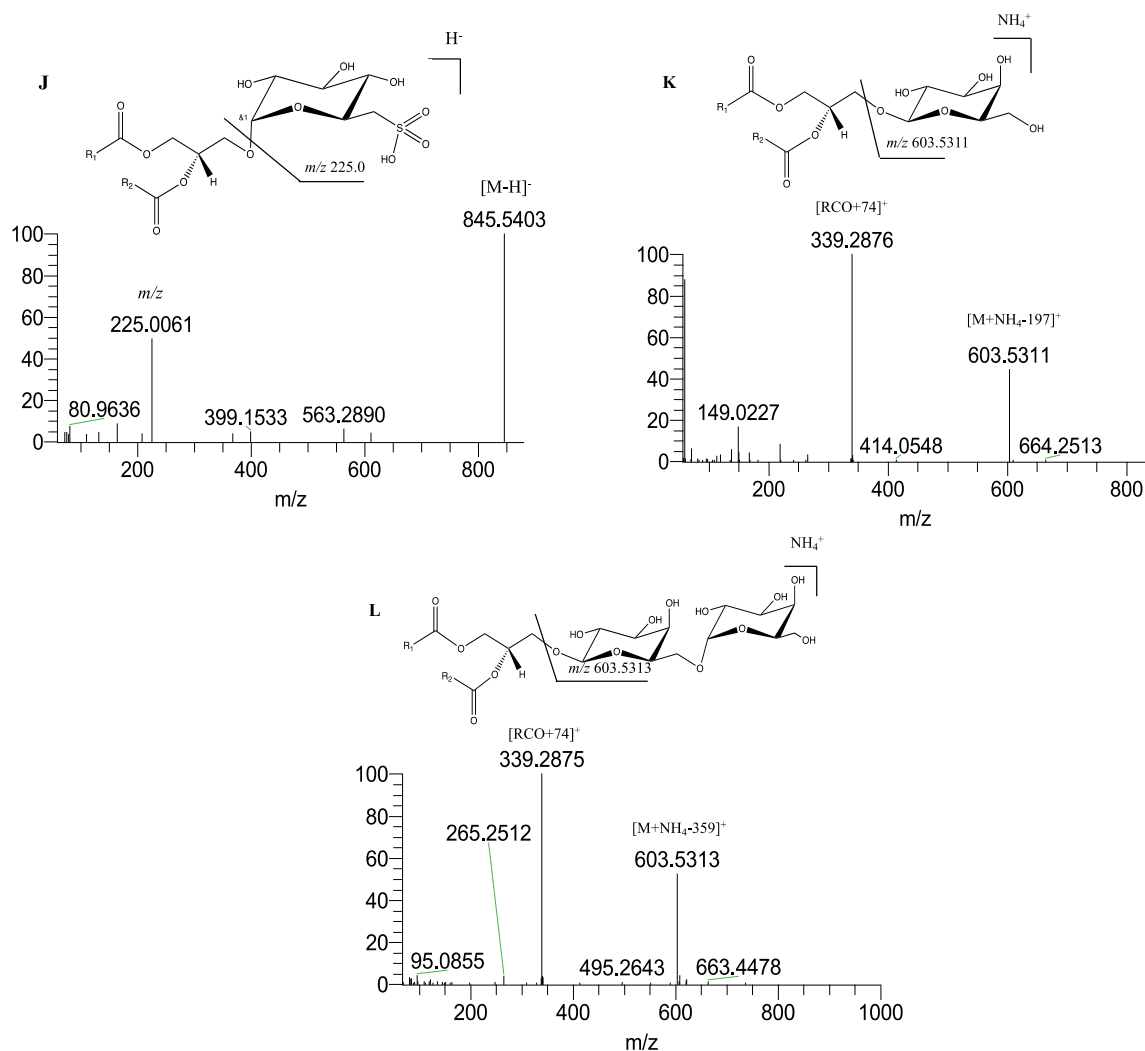


Figura 20. Espetros de LC-MS/MS das diferentes classes de gliceroglicolípidos identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina no modo de ionização negativa e positiva com uma estrutura molecular representativa de cada classe lipídica. (J) SQDG(36:2) a m/z 845.5403 como $[M-H]^-$; (K) MGDG(36:2) a m/z 800.6253 como $[M+NH_4]^+$ e (L) DGDG(36:2) a m/z 962.6777 como $[M+NH_4]^+$.

3.9.4.3. Esteróis glicosilados acilados derivados de sitosterol

Neste trabalho, foram identificadas quatro espécies moleculares de ASGs derivados de sitosterol no óleo de sementes de azeitona Arbequina, no modo de ionização positiva como aductos de amónio ($[M+NH_4]^+$). O ião mais abundante observado nos espectros de LC-MS foi detetado a m/z 856.702 (Figura 21), e que correspondia ao ASG(18:2-Glc-Sitosterol).

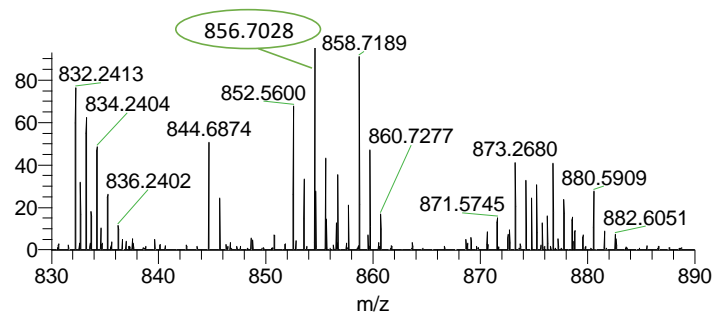


Figura 21. Espectro de LC-MS da classe de esteróis glicosilados acilados identificados no óleo de sementes de azeitona Arbequina, no modo de ionização positiva, como iões $[M+NH_4]^+$.

Os espectros de MS/MS dos ASG derivados de sitosterol mostraram a fragmentação característica desta classe lipídica, pela presença de um ião produto de intensidade abundante a m/z 397.38, e que corresponde ao sitosterol livre (Figura 22).

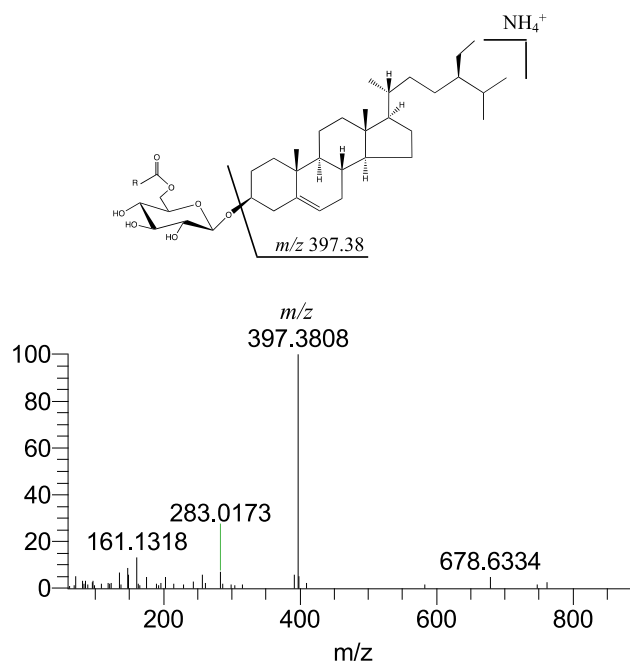


Figura 22. Espectro de LC-MS/MS do ião $[M+NH_4]^+$ do ASG(18:1-Glc-Sitosterol) a m/z 858.7189 identificado no óleo de sementes de azeitona Arbequina, com a respetiva estrutura molecular.

3.9.4.4. *Esfingolípidos*

Na fração rica em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona também foram identificados esfingolípidos, nomeadamente ceramidas (Cer) e HexCer. Foram

identificadas oito espécies moleculares de HexCer e sete de Cer, no modo de ionização positiva, como iões $[M+H]^+$. Os espectros de MS/MS destas classes lipídicas revelaram iões característicos das bases esfingóides, nomeadamente bases de cadeia longa di- e tri-hidroxi (d18:2 ou 4,8-esfingadienina, t18:0 ou fitosfingosina e t18:1 ou fitosfinguenina ou 4-hidroxi-8-esfinguenina). Nas espécies moleculares de Cer e HexCer, a base esfingóide continha principalmente o aminoálcool C18, enquanto as cadeias de FAs variaram entre C16:0 e C26:0 e algumas eram hidroxiladas. Como exemplo, está ilustrado na Figura 23M o espectro de MS/MS da HexCer(t34:2), encontrado a m/z 714.55. Este espectro mostrou a perda neutra de uma hexose (-180 Da, -Hex) e a perda combinada de hexose com água (-198 Da, -Hex-H₂O) a partir do ião precursor. Da mesma forma, foram observados iões produto, com elevada abundância, atribuídos à base esfingóide a m/z 262.25 (perda de duas moléculas de água da base da cadeia longa ($[d18:2+H-2H_2O]^+$) e, em menor abundância, a m/z 280.26 (perda de uma molécula de água da base de cadeia longa ($[d18:2+H-H_2O]^+$)).

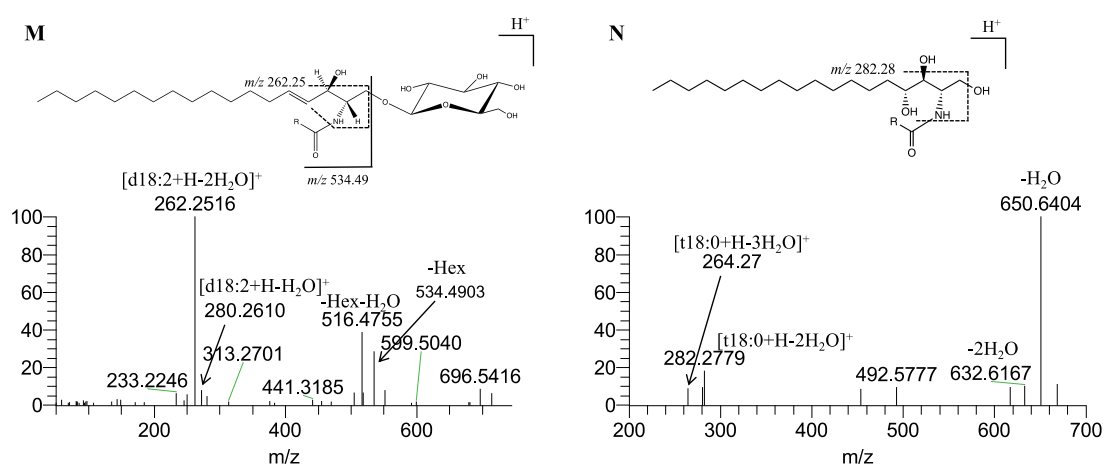


Figura 23. Espectros de LC-MS/MS de hexosilceramida (HexCer) e de ceramida (Cer) identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina no modo de ionização positiva como $[M+H]^+$ e respetiva estrutura molecular. (M) HexCer(t34:2) a m/z 714.55; (N) Cer(t41:1(OH)) a m/z 668.62.

Os resultados da quantificação relativa das diferentes famílias de lípidos polares e das respetivas classes (Tabela 21) mostraram que os gliceroPLs eram a classe lipídica mais abundante (87,72%), seguidos pelos gliceroGLs (9,79%), esfingolípido (1,58%) e ASGs (0,90%).

Tabela 21. Abundância relativa (em %) das classes de lípidos polares identificadas no óleo de sementes de azeitona Arbequina por HPLC-ESI-MS/MS

Abundância relativa (%)		
	Média	Desvio padrão
Glicerofosfolípidos	87,72	1,34
PC	48,29	60,10
PA	28,84	35,50
LPC	8,94	9,85
PI	8,38	14,84
NAPE	3,85	5,59
PG	1,22	2,09
PE	0,44	1,18
LPA	0,03	0,05
LPE	0,02	0,06
LPI	0,01	0,01
Gliceroglicolípidos	9,79	1,44
SQDG	65,03	65,52
DGDG	12,32	13,66
MGDG	12,15	9,76
SQMG	10,50	33,90
DGMG	0,01	0,04
Esfingolípidos	1,58	0,20
HexCer	91,54	101,40
Cer	8,46	7,06
Esteróis glicosilados acilados	0,90	0,16
ASG	0,90	0,16
Total	100	3,14

Os valores representam a média \pm desvio padrão de cinco amostras com duplicado analítico ($n = 10$) normalizadas para o padrão interno utilizado no LC-MS.

Nas classes fosfolipídicas, a PC foi a classe mais abundante (48,29%). Relativamente aos GLs, a classe mais abundante foi SQDG (65,03%) e, para os esfingolípidos, as HexCer (91,54%) foram a classe mais abundante. Estes resultados foram obtidos usando os valores da área do pico cromatográfico de cada ião. A normalização dos dados foi realizada dividindo as áreas dos iões correspondentes às espécies moleculares de cada classe pela área dos iões que foram designados como padrão interno de cada classe. Como não foi usado nenhum padrão interno para as classes de NAPE, SQDG e SQMG, as respectivas espécies moleculares foram normalizadas usando o padrão interno de PG(28:0), que tinha o mesmo tempo de

retenção. Além disso, as classes de MGDG, DGDG ASG, HexCer e Cer foram normalizadas usando o padrão interno de ceramida (Cer(d35:1)), pelo mesmo motivo.

3.10. Atividade antimicrobiana de lípidos polares

Após o estudo da composição lipídica do óleo de sementes de azeitona, procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana de padrões de lípidos polares existentes no óleo e de extratos lipídicos enriquecidos em lípidos polares obtidos por fracionamento do óleo de sementes, com uma estirpe de MRSA (estirpe DSM 25693). Para isso, determinou-se as MICs pelo ensaio de microdiluição em caldo, em ambos os casos.

Na Figura 24 estão representados os resultados obtidos para a avaliação do efeito dos padrões de lípidos polares (PLs (PA, PI, PE, PG e PC), GLs (DGDG, MGDG e SQDG), esfingolípidos (GalCer) e ASGs) na inibição do crescimento da bactéria de MRSA (DSM 25693). O controlo de bactéria manteve-se estável em todas as concentrações testadas. O controlo de DMSO mostrou que a presença deste veículo afetou a viabilidade do MRSA, de forma significativa, nas duas concentrações mais altas (2,5 e 5,0 mg mL⁻¹). Por outro lado, nessas duas concentrações, verificou-se que a DO de vários padrões era muito superior à DO do controlo de DMSO, embora inferior à do controlo negativo (controlo de bactéria). Isto é explicado pelo facto de, na preparação dos ensaios de microdiluição, ter-se verificado que a adição dos padrões de MGDG, DGDG, PI e ASG ao inóculo causavam turvação da mistura, ao contrário do que acontecia com a adição dos restantes lípidos. Também o padrão de GalCer, quando misturado com o inóculo, na microplaca, formava pequenos precipitados visíveis no fundo do micropoço. Por esse motivo, não foi possível avaliar o efeito destes padrões na inibição do crescimento bacteriano na concentração mais alta (5,0 mg mL⁻¹), uma vez que a DO nestes poços era mascarada por esse fator. Por outro lado, na concentração mais alta (5,0 mg mL⁻¹), as classes de PE e SQDG não causaram efeito inibitório, apresentando uma DO semelhante e próxima da do controlo de DMSO. Na mesma concentração, verificaram-se diferenças significativas entre o controlo de bactéria e dos padrões de PC e PA que também eram significativamente diferentes do controlo de DMSO.

De uma forma geral, os padrões de lípidos foram ineficazes contra o MRSA, uma vez que a sua presença, no intervalo de concentrações testada, não causou inibição do crescimento bacteriano. A exceção foi o padrão da classe de PE que mostrou

diferenças significativas relativamente ao controlo de DMSO nas concentrações de 0,62 mg mL⁻¹, 0,31 mg mL⁻¹ e 0,16 mg mL⁻¹. Embora os resultados sejam preliminares, parece observar-se um efeito da presença de PE na viabilidade bacteriana que não é inibida pela presença do DMSO, mas parece ter um efeito protetor.

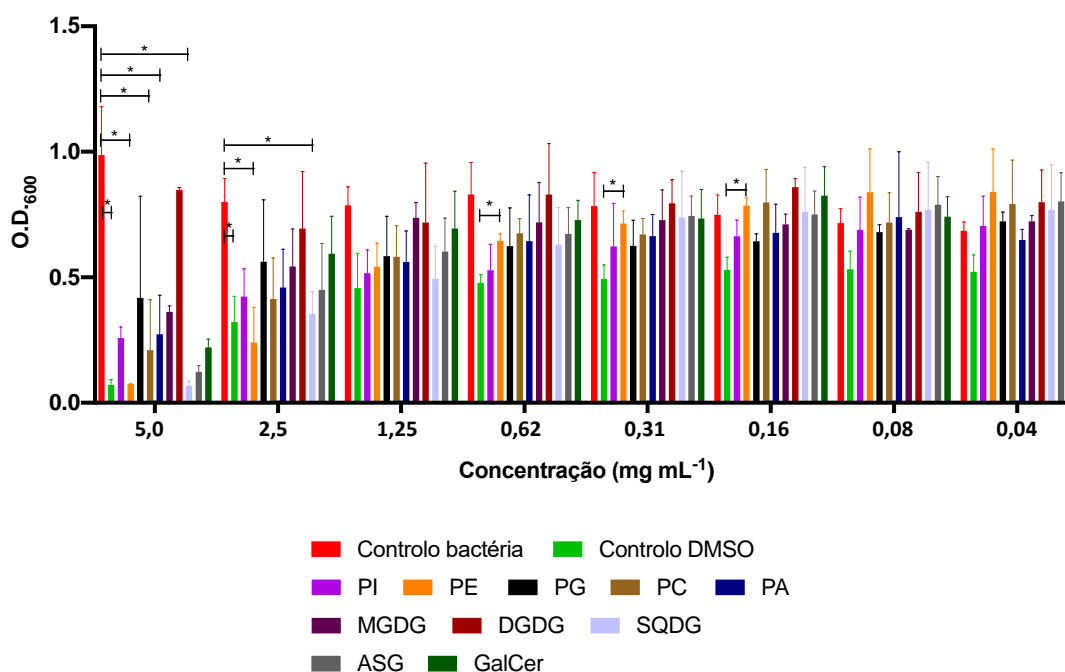


Figura 24. Atividade antimicrobiana dos padrões de lípidos avaliada pelo método de microdiluição em caldo contra a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (estirpe DSM 25693).

No que diz respeito à análise da atividade antimicrobiana das frações enriquecidas em lípidos polares obtidas após fracionamento do óleo de sementes de azeitona (Figura 25), não foram observadas diferenças significativas entre os controlos e os testes, verificando-se que os extratos lipídicos não tiveram efeito contra a bactéria, nas concentrações testadas. De salientar que, à semelhança do que foi observado para os padrões de lípidos referidos acima, e que causaram turvação ou precipitação no meio quando adicionados ao inóculo (PI, ASG, MGDG, DGDG e GalCer), também na adição do extrato lipídico se observou turvação, pelo que foi lida a DO antes e depois da incubação, de forma a subtrair o efeito turvação. Os padrões mencionados, têm em comum a presença de um ou mais resíduos de açúcar na sua estrutura. A exceção foi o padrão de GL SQDG, que não causou nenhum efeito observável por adição ao inóculo.

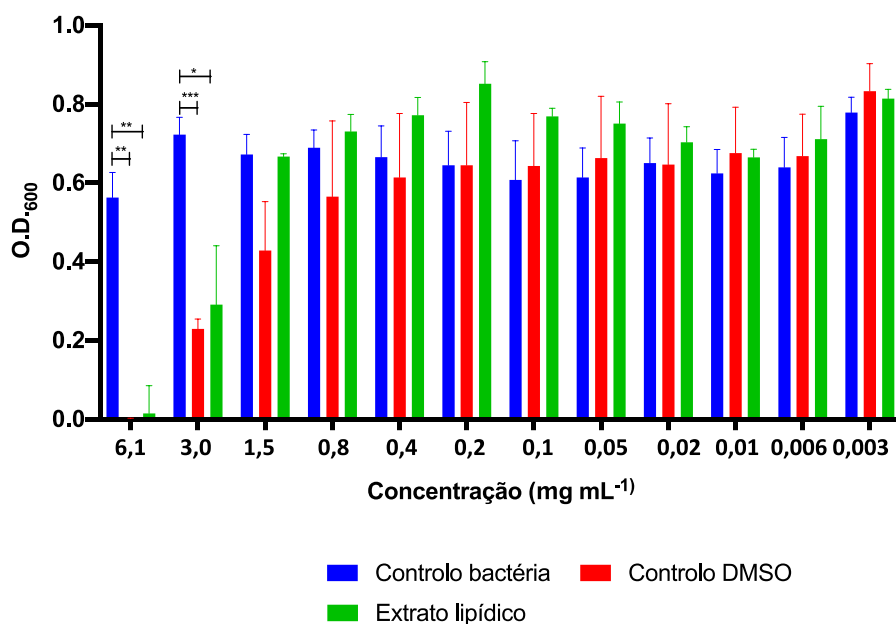


Figura 25. Atividade antimicrobiana das frações enriquecidas em lípidos polares obtidas a partir do óleo de sementes de azeitona avaliada pelo método de microdiluição em caldo contra a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (estirpe DSM 25693).

4. Discussão

As sementes de azeitona e o seu óleo têm sido pouco estudados mas, nos últimos anos, tem surgido um interesse crescente nestas sementes do ponto de vista da alimentação funcional e como matéria-prima rica em compostos naturais com atividade biológica. O trabalho realizado no âmbito desta dissertação de mestrado teve como objetivo estudar o perfil lipídico do óleo de sementes de azeitona como forma de conhecer o potencial desta matriz para novas aplicações na alimentação e em outras indústrias. Para tal, utilizou-se uma abordagem metodológica baseada em lipidómica, como descrito nos capítulos anteriores.

As sementes de azeitona Arbequina da região de Nelas apresentaram um rendimento em óleo de 12,70 a 24,15% (Tabela 8). As sementes do grupo de Oliveira de Barreiros apresentaram menor rendimento em óleo (12,70%) relativamente às amostras do grupo de Canas de Senhorim (24,15%). De acordo com a literatura, as sementes de azeitona contêm 27,3 a 53,0% de lípidos (29–31). No estudo de Moussaoui et al. (2008), foi utilizada a variedade de azeitona Chemlal, cultivada na Argélia, e os métodos de Soxhlet e reator aberto com o solvente n-hexano para a extração de lípidos (31). Maestri et al. (2019) utilizaram a variedade de azeitona Picual e extraíram os lípidos com o método de Soxhlet com o solvente n-hexano (30). O rendimento obtido neste trabalho foi inferior ao apresentado na literatura, podendo estar relacionado com a variação de diversos fatores como o método de extração lipídica, a variedade de azeitona, o seu estado de maturação, a origem geográfica e variáveis edafo-climáticas (tipo de solo, clima, precipitação, altitude, etc) (184). O teor de óleo nas sementes de azeitona encontra-se próximo do teor das sementes de ameixa (27), cereja (27), goiaba (37), maçã (39–42), manga (43), marmelo (3), mirtilo (45), nectarina (27), pera (39), romã (48) e uva (33,49).

O óleo de sementes de azeitona é constituído por 80% (71) a 97% de TAGs (77), 8% de FAs livres (71), e nos restantes 5% foram encontrados MAGs (71) e alguns PLs (114). A TLC do extrato lipídico total das sementes de azeitona das duas regiões geográficas permitiu separar as classes lipídicas com base na sua polaridade (Figura 9). Conforme esperado, os principais componentes lipídicos do óleo de sementes de azeitona são os TAGs. Para além destes, foi possível verificar a existência de outras classes lipídicas menos abundantes como ésteres de esterol, FAs livres, esteróis, lípidos polares, e outros lípidos não identificados por esta técnica.

O óleo de sementes de azeitona é principalmente constituído por acilgliceróis. A maioria dos FAs que o compõe estão esterificados em outros lípidos, maioritariamente TAGs. Os resultados obtidos neste trabalho para o perfil de FAs totais demonstraram que o óleo de sementes de azeitona contém principalmente ácido oleico (63,07-65,44%), ácido linoleico (16,83-19,15%) e ácido palmítico (12,08-12,59%) (Tabela 9). Estes resultados coincidem com os previamente reportados para este óleo (29,76,77). No entanto, neste trabalho foi identificado o ácido pentadecanóico (15:0) nesta matriz, embora não tenha sido identificado o ácido heptadecenóico (17:1) como referido em outros estudos (29,76,77). Estas diferenças podem estar relacionadas com o facto de nos estudos realizados por outros autores terem sido analisadas azeitonas de variedades e origens geográficas diferentes, tais como Chemlal, Galega, Leccino, Dritta, Caroleo, Coratina, Castiglione, Carboncella e Nebbi e de o método de análise ser também diferente como o GC-MS e o GC-FID.

Nos estudos referidos, o óleo de sementes de azeitona apresentava 11,95-24,08% de SFAs, 59,43-69,26% de MUFAs e 16,65-24,64% de PUFAs, o que coincide com os valores obtidos no presente trabalho (Tabela 9). As diferenças entre a abundância de SFAs, MUFAs e PUFAs podem estar mais uma vez relacionadas com a variedade de azeitona, o seu estado de maturação, a origem geográfica, variáveis edafo-climáticas (tipo de solo, clima, precipitação, altitude, etc.) e com o método analítico (184).

Como referido no capítulo 1, secção 1.2.1.1, o 18:1 está associado a uma diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diminuição do colesterol LDL e a um aumento do colesterol HDL (185). O 18:1 é encontrado em grande abundância no óleo de sementes de azeitona, proporcionando-lhes características benéficas do ponto de vista nutricional. Os PUFAs *n*-6 e *n*-3 são considerados fatores protetores de risco de doenças cardiovasculares (58). No óleo de sementes de azeitona, o 18:2 *n*-6 é o segundo FA mais abundante. Os FAs *n*-6 permitem a diminuição do colesterol sérico, HDL e LDL (51,59,60). Já os PUFAs *n*-3 apresentam baixo teor no óleo de sementes de azeitona, mas estes FAs contribuem para a redução dos níveis de LDL, e do colesterol sérico total (58). Os SFAs como o 16:0 são considerados FAs promotores de doença, pois aceleram a formação de trombos (trombogénicos) (58). No óleo de sementes de azeitona, o 16:0 é o terceiro FA mais abundante.

Comparando os valores obtidos com outras sementes de frutos, o conteúdo de MUFA do óleo de sementes de azeitona é superior ao dos óleos de sementes de maçã (39-42), pera (39), abóbora (34,83), uva (84,85), melancia (44), laranja (38), marmelo

(3), amendoim (3), maracujá (73), abacate (32), cereja (27), pêsego (27), amora (35), sabugueiro (35), figo-da-Índia (36), mirtilo (45), romã (48), kiwi (37) e goiaba (37). Já o teor de PUFA do óleo de sementes de azeitona é superior ao dos óleos de sementes de papaia (46,47) e manga (43). Por outro lado, o conteúdo de SFA do óleo de sementes de azeitona é superior ao dos óleos de sementes de maçã (39–42), pera (39), abóbora (34,83), uva (84,85), alperce (3), marmelo (3), amendoim (3), maracujá (73), cereja (27), nectarina (27), pêsego (27), ameixa (27), amora (35), sabugueiro (35), mirtilo (45), manga (43), kiwi (37) e goiaba (37).

O perfil de FAs totais de uma matriz alimentar permite calcular índices lipídicos como indicadores de fatores de risco cardiovascular, nomeadamente risco de aterogénese e trombogénese (61). De acordo com os índices lipídicos obtidos (Tabela 10), pode-se afirmar que o óleo de sementes de azeitona apresenta baixo risco de desenvolver doenças cardiovasculares, tal como acontece com o azeite. Ambos são ricos em MUFAs *n*-9 e PUFAs *n*-6, contendo uma pequena porção de PUFAs *n*-3, cuja ingestão está associada à diminuição de vários fatores de risco de doença cardiovascular. Por seu lado, estes índices, são bastante elevados para o óleo de coco (61), que se referiu na Tabela 10 para comparação, demonstrando que este óleo, cuja utilização na culinária tem estado muito em voga como alternativa a outros óleos vegetais, também pela sua organolética agradável, não atua como alimento protetor, pois apresenta um elevado risco de provocar doenças cardiovasculares, dado o seu alto conteúdo em SFAs.

Além dos FAs totais, pretendia-se com este trabalho estudar, com maior detalhe, outras classes de lípidos, nomeadamente os TAGs e os lípidos polares. Em matrizes oleicas, ricas em TAGs e com quantidades baixas de lípidos polares (inferiores a 5%, normalmente) é necessário, após a extração lipídica total, recorrer a processos de fracionamento e enriquecimento por forma a conseguir obter, de forma eficiente, os lípidos de maior polaridade (175). Para realizar esse fracionamento, recorre-se normalmente a técnicas de SPE com colunas de sílica funcionalizada com grupos aminopropilo (NH₂). Vários trabalhos utilizaram esta abordagem para recuperar PLs, GLs e outros lípidos polares a partir de fluidos biológicos, como plasma sanguíneo (175,178,180), óleos (138), e plantas (179). Para tal, utilizaram diferentes sistemas de solventes atendendo às diferentes naturezas químicas dos compostos e à força iónica dos solventes. No entanto, estes estudos não consideram a complexidade química dos

lípidos polares de matrizes como as de origem vegetal, que contêm além dos PLs e GLs, glucósidos, esfingolípidos, entre outros (138).

Segundo a literatura, as sementes de frutos e as matrizes vegetais, em geral, contêm mais de uma dezena de classes destes lípidos pelo que um fracionamento pouco eficiente poderia levar à não identificação de várias classes e, por conseguinte, de espécies moleculares. Neste trabalho, pretendeu-se melhorar o processo de recuperação dos lípidos polares do óleo de sementes de azeitona, uma vez que este óleo contém cerca de 2,27-2,57% de lípidos polares (Tabela 11). Para tal, otimizou-se um processo de fracionamento lipídico com SPE-NH₂ e diferentes sistemas de solventes, considerando: a) a complexidade da composição em lípidos polares dos óleos de sementes ou matrizes vegetais ricas em óleo; b) a polaridade das diferentes classes de lípidos polares; c) a composição de diferentes misturas de solventes que permitissem a eluição de todas as classes desses lípidos, atendendo à força iónica dos solventes.

Assim, no início da otimização do processo de fracionamento de uma mistura complexa de lípidos polares por SPE-NH₂ foram testados três processos que consistiam na utilização de dois eluentes (i.e., misturas de solventes) cada um. Todos os eluentes tinham sido utilizados anteriormente por outros autores, noutros trabalhos, embora nunca tenham sido aplicados simultaneamente nem aplicados ao óleo de sementes de azeitona. Estes processos foram aplicados a uma mistura de padrões de lípidos polares comerciais, que mimetizava uma matriz vegetal, contendo classes de lípidos que já foram identificadas neste tipo de matrizes biológicas.

Após TLC de cada uma das frações de lípidos polares obtidas com cada eluente e posterior quantificação de fósforo para estimar a quantidade de PL em cada fração, verificou-se que o processo 1 [eluente (3) e metanol/clorofórmio (1:1, por volume)] permite a recuperação de 37,43% de PLs, nomeadamente LPC, PC, PE, PG, PS e SM, e de outras classes, como DGDG, MGDG, GalCer, DGTS e MGTS. O processo 2, que consistia na eluição com eluente (3) e eluente (4), recuperou cerca de 120,73% da quantidade de PLs e permitiu a recuperação das classes de PLs mencionadas para o processo 1 e, além dessas, conseguiu também recuperar as classes de PS e PG com SQDG. Por outro lado, o processo 3 [eluente (3) e eluente (5)] permitiu a recuperação das mesmas classes lipídicas recuperadas pelos processos 1 e 2, mais as classes de PI e PA. A determinação da quantidade recuperada de cada classe de PLs com o processo 3 não foi possível devido à presença de ácido fosfórico, inicialmente presente no eluente (5), e que ficou a contaminar a fração de lípidos polares. O eluente (3), utilizado nos três

processos, foi o que permitiu recuperar a maioria das classes de lípidos polares, nomeadamente LPC, SM, DGDG, MGTS, PC, GalCer, PS, MGDG, DGTS e PE. O eluente (4), além de recuperar também a classe de PS, recuperou a classe de PG que elui simultaneamente com SQDG. Por outro lado, o eluente (5), além de PS e PG/SQDG, foi o único eluente que permitiu obter frações com classes de PI e PA. Este eluente (5), adaptado de Kim & Salem (1990) (180), em que o ácido fosfórico foi substituído por ácido fórmico, apresenta uma maior força iónica do que os outros eluentes usados e, assim, permite recuperar os lípidos polares mais acídicos, como as classes de PA e PI. A quantificação de fósforo nas frações recuperadas permitiu constatar que o processo 2 era o mais eficiente mas que nenhum dos processos isoladamente era completamente eficiente pois nenhum deles, por si só, conseguia recuperar todas as classes lipídicas.

Após avaliar a recuperação das diferentes classes de lípidos polares com os três sistemas referidos anteriormente, constatou-se que era possível recuperar todas as classes em estudo recorrendo à combinação dos diferentes sistemas de solventes. Consequentemente, testou-se a recuperação da totalidade das classes de lípidos polares da mistura de padrões, utilizando um novo sistema de solventes com três eluentes polares, por esta ordem de eluição: eluente (3), eluente (4) e eluente (5). Avaliou-se cada uma das frações recolhidas separadamente, e uma fração combinada pela junção das frações obtidas com cada um dos eluentes, por forma a avaliar que classes de lípidos polares eram obtidas com cada eluente. A TLC demonstrou que o novo sistema de solventes permite recuperar todas as catorze classes lipídicas da mistura de padrões. O eluente (3) permite recuperar a maioria das classes lipídicas, nomeadamente LPC, DGDG, SM, PC, GalCer, MGDG, PG, DGTS, SQDG, PE, PA e ASG. Embora este eluente não seja acídico, permitiu recuperar uma parte de PAs. O eluente (4) recuperou as classes de lípidos aniónicos PI, PS, PG, SQDG e PA. Por outro lado, o eluente (5) recuperou o restante de PA. Verificou-se que a eluição sequencial dos lípidos polares com os três eluentes permite recuperar todas as classes da mistura, ao contrário de se usar os eluentes separadamente. Desta forma, a junção dos três eluentes permitiu recuperar todas as classes de PLs (LPC, SM, PC, PI, PS, PG, PE e PA). Também permitiu a recuperação das classes de GLs neutros DGDG e MGDG, GLs aniónicos (SQDG), glicosfingolípidos (GalCer), betaínas (DGTS), e glucósidos (ASG). Após TLC das frações enriquecidas, procedeu-se à quantificação de PLs. A quantificação das classes de PLs na fração enriquecida em lípidos polares [eluída com os eluentes (3), (4)

e (5)], obtida após SPE e separada por TLC, demonstrou que a percentagem de recuperação de cada classe era superior a 70%, sendo em média 100%.

Os lípidos neutros ou zwitteriônicos, como as classes de PC e PE e as suas formas liso, e os GLs neutros MGDG e DGDG, são facilmente eluídos com metanol ou misturas compostas maioritariamente por metanol, em colunas SPE-NH₂. Nas colunas com grupos aminopropilo, os lípidos acídicos ou aniônicos ficam fortemente retidos e é necessário um solvente de maior força iónica para os eluir. Kim & Salem (1990), Suzuki *et al.* (1993) e Christie *et al.* (1998) tinham como objetivo conseguir recuperar classes específicas de lípidos polares a partir de matrizes biológicas, nomeadamente de lípidos aniônicos como PG, SQDG, PA e PI por SPE (178–180). Para tal utilizaram colunas de sílica com grupos NH₂ e testaram diferentes sistemas de solventes, por forma a conseguir uma eficiência que outros métodos utilizados anteriormente não conseguiram, na recuperação destas classes lipídicas. Nesses trabalhos conseguiram recuperar as referidas classes porque utilizaram eluentes com maior força iónica e maior polaridade para recuperar classes de lípidos aniônicos ou acídicos como as classes de PS, PG, SQDG, PA, PI e CL, esta última, uma classe de lípidos presente na membrana interna das mitocôndrias. Suzuki *et al.* (1993) e Kim & Salem (1990) analisaram plasma e mimetizaram as classes lipídicas dessa matriz (178,180). Por outro lado, nas plantas existem nos cloroplastos os SQDG, por exemplo. Christie *et al.* (1998) (179) demonstraram a recuperação das classes de SQDG, PG e PI de plantas (folhas de *Arabidopsis thaliana*) com a mistura de solventes utilizada por Suzuki *et al.* (1993) (178). O método otimizado no presente trabalho para a obtenção da fração enriquecida em lípidos polares, a partir de um extrato lipídico, é eficiente e nunca foi usado no óleo de sementes de azeitona nem noutras matrizes. Portanto, tem potencial para aplicação neste tipo de matrizes e também noutras matrizes biológicas e alimentares.

O protocolo de fracionamento para a recuperação eficiente dos lípidos polares de matrizes complexas foi aplicado ao óleo de sementes de azeitona. Inicialmente, foram recuperados os lípidos apolares e os de polaridade intermédia. Para tal, foi utilizado primeiramente um eluente apolar para eluir os TAGs e os ésteres de esterol, um eluente de polaridade intermédia para eluir os esteróis, FAs livres e outros lípidos de polaridade semelhante, e, por fim, os eluentes polares (3), (4) e (5) para eluir os lípidos polares. Depois da re-extração lipídica nas frações enriquecidas eluídas com os eluentes (4) e (5), as três frações foram combinadas para posterior análise.

Após fracionamento do óleo de sementes de azeitona, verificou-se que a fração de lípidos neutros, nomeadamente ésteres de esterol e TAGs, correspondia a 79,38-94,50% do óleo, a fração de lípidos de polaridade intermédia correspondia a 3,26-18,10% e a fração de lípidos polares correspondia a 2,24-2,57% (Tabela 15). Comparando as duas regiões geográficas em estudo, o óleo de sementes de azeitona de Oliveira de Barreiros apresenta um conteúdo mais elevado de lípidos neutros quando comparado com o óleo de sementes de azeitona de Canas de Senhorim. O óleo de sementes de azeitona de Oliveira de Barreiros apresenta um teor de lípidos de polaridade intermédia, nomeadamente FAs livres, mais baixo que o óleo de sementes de azeitona de Canas de Senhorim. As diferenças observadas, uma vez que se trata da mesma variedade de azeitona, podem estar relacionadas com o estado de maturação e variáveis edafo-climáticas (184).

Bianchi e Vlahov (1994) quantificaram 80% de TAGs no óleo de sementes de azeitona da variedade italiana Coratina (71) enquanto Ranalli *et al.* (2002) quantificaram 90% de TAGs no óleo de sementes de azeitona de sete variedades italianas diferentes, como referido anteriormente (77). Os valores obtidos neste trabalho para a fração de lípidos apolares são similares aos obtidos por estes autores. Comparativamente a outras sementes de frutos, o conteúdo em TAGs das sementes de azeitona Arbequina é próximo do conteúdo das sementes de papaia (86), tamareira (75), maçã (88) e uva (89).

A fração de lípidos de polaridade intermédia inclui FAs livres, esteróis, e outros lípidos, presumivelmente MAGs e DAGs, conforme verificado por TLC do extrato lipídico total (Figura 9). Ranalli *et al.* (2002) quantificaram 0,41% de esteróis no óleo de sementes de azeitona (77) e Bianchi e Vlahov (1994) quantificaram 8% de FAs livres (71). Desta forma, a literatura refere 8,41% de lípidos de polaridade intermédia (esteróis e FAs livres) no óleo de sementes de azeitona. Os valores obtidos neste trabalho estão concordantes com os valores referidos na literatura. Contudo, a composição lipídica da azeitona varia de acordo com diversos fatores, como enunciado anteriormente, pelo que esta comparação é meramente orientadora.

A fração de lípidos polares do óleo de sementes de azeitona Arbequina corresponde a 2,24-2,57% do óleo (Tabela 15). A percentagem de PLs obtida para a região de Oliveira de Barreiros foi de 0,60% e para a região de Canas de Senhorim foi de 0,68%. Moussaoui *et al.* (2008) quantificaram 0,12 a 0,14% de PLs no óleo de sementes de azeitona da variedade Chemlal cultivada em Kabylia (Argélia) (31). Vieira *et al.* (2018)

quantificaram 0,90% de PLs no óleo de sementes de azeitona da variedade Galega da região da Bairrada, Portugal (114). A quantidade de GLs no óleo de sementes de azeitona (em média, 1,89%) foi reportada pela primeira vez neste trabalho e é superior à percentagem de PLs (0,68%) (Tabela 11). A percentagem de GLs obtida para a região de Oliveira de Barreiros foi de 1,67% e para a região de Canas de Senhorim foi de 1,89%, ou seja, foram equivalentes nas duas regiões. Bianco *et al.* (1998) determinaram a concentração de um GL (DGDG) na polpa da azeitona, que correspondia a 0,028% (137). Este trabalho demonstrou que a quantidade de GLs na semente de azeitona é o triplo da quantidade de PLs, conforme evidenciado através da razão GLs/PLs (Tabela 11). Verificou-se que a quantidade de PLs e GLs é semelhante entre os dois grupos estudados. A quantidade de PLs obtida neste trabalho para as sementes de azeitona é superior à descrita na literatura, o que pode ser influenciado por diversos fatores, como a variedade da azeitona, variáveis metodológicas e variáveis edafo-climáticas, entre outras. Comparando estes resultados com os obtidos para outras sementes de frutos, a quantidade de PLs no óleo de sementes de azeitona é inferior à quantidade encontrada nos óleos de sementes de abacate (7,4-10,9%) (112), framboesa (3,5%) (72) e melão (2,1%) (113). No que se refere à quantidade de GLs, o óleo de sementes de azeitona apresenta um valor de GLs inferior ao dos óleos de sementes de abacate (12,0-13,2%) (112) e melão (6,4%) (113).

Uma vez determinada a percentagem de lípidos apolares, de polaridade intermédia e polares do óleo de sementes de azeitona, calculadas após fracionamento do óleo, procedeu-se à análise das frações de lípidos apolares e polares, separadamente, por espectrometria de massa.

Os TAGs são o principal componente lipídico do óleo de sementes de azeitona e da fração de lípidos neutros. Na análise da fração rica em lípidos neutros por ESI-Q-ToF-MS com injeção direta, foram identificados doze iões diferentes e um total de trinta e três espécies moleculares. Os iões mais abundantes foram encontrados a m/z 902.9, TAG(54:3), m/z 876.9, TAG(52:2) e m/z 900.9, TAG(54:4), que correspondem ao OOO, ao OOP e ao OOL, respetivamente. Estes TAGs contêm nas suas cadeias acil os FAs maioritários do óleo de sementes de azeitona: o 18:1, o 16:0 e o 18:2. Ranalli *et al.* (2002) identificaram nove espécies moleculares diferentes no óleo de sementes de azeitona de sete variedades italianas (77). No entanto, Bianchi *et al.* (1994) identificaram dezoito espécies moleculares diferentes no óleo de sementes de azeitona da variedade italiana Coratina, sendo os mais abundantes os mesmos TAGs que no

presente trabalho e no estudo de Ranalli *et al.* (2002) (71). Da mesma forma, Alves *et al.* (2018) identificaram quinze iões diferentes no óleo de sementes de azeitona variedade Galega da região da Bairrada e um total de trinta e cinco espécies moleculares, em que os TAGs mais abundantes são os mesmos mencionados anteriormente (76). Comparando com trabalhos semelhantes com outras sementes de frutos, no óleo de sementes de azeitona foram identificados mais TAGs do que nos óleos de sementes de papaia (42,86) e maçã (88), nomeadamente os TAG(50:2), TAG(52:4), TAG(52:3), TAG(52:2), TAG(52:1), TAG(54:6), TAG(54:2), TAG(54:1), TAG(56:3), TAG(56:2) e TAG(56:1). Os TAGs têm um grande valor nutricional e nutracêutico, e portanto, são uma fonte comum em óleos alimentares para consumo humano e fins industriais. De facto, as sementes de azeitona são ricas em TAGs e podem ser aproveitadas na indústria de óleos alimentares para consumo humano com base nestes compostos.

Na fração enriquecida em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona, obtida após SPE, determinou-se a percentagem de recuperação de PLs e de GLs. A coluna de sílica tinha sido inicialmente carregada com cerca de 8 mg de extrato lipídico, pelo que era esperado obter 54,25 µg de PLs e 150,56 µg de GLs, caso a recuperação destes lípidos fosse de 100%, tendo em conta a percentagem destes lípidos no óleo. Após o fracionamento do extrato, obtiveram-se 51,92 µg de PLs e 137,66 µg de GLs, sendo que as percentagens de recuperação foram 95,71% e 91,43%, respetivamente. Verificou-se, então, que o método de fracionamento utilizado é eficiente pois permitiu recuperar quase a totalidade de PLs e GLs a partir de uma matriz muito complexa.

A TLC permitiu separar as classes obtidas após SPE, e verificar a presença de nove classes de lípidos polares: cinco classes de PLs (PA, PI, PC, LPC e PE), duas classes de GLs (DGDG e MGDG) e uma classe de glucósidos (ASG). As classes de PG e SQDG têm o mesmo fator de retenção (R_f , do inglês, *retention factor*) na TLC, motivo pelo qual não é possível separá-las com esta técnica. Contudo, foi observada uma banda com um R_f concordante com os respetivos padrões de lípidos, indicando a presença de uma ou de ambas as classes dos referidos lípidos. Além disso, foram visualizadas duas bandas (bandas 8 e 10, Figura 14) correspondentes a classes de lípidos que não foram identificadas com esta técnica e que cujo R_f não coincidia com nenhum dos padrões de lípidos utilizados. Além disso, ambas as bandas quantificaram fósforo e glucose. Desta forma, poderá inferir-se a presença de uma classe de glicoPLs ou fosfoGLs, ou a

presença de duas classes de lípidos com o mesmo R_f , sendo uma classe de PL e outra classe de GL.

A análise da fração enriquecida por HPLC-ESI-MS/MS de alta resolução permitiu identificar todas as classes lipídicas anteriormente mencionadas, reveladas por TLC, no óleo de sementes de azeitona. Além dessas, foram identificadas outras nove classes: quatro de PLs (LPA, LPI, LPE e NAPE), três de GLs (SQDG, SQMG e DGMG) e duas de esfingolípidos (HexCer e Cer). Esta análise permitiu confirmar a presença da classe de PLs PG, e da classe de GLs SQDG, incluindo a forma liso desta classe, SQMG. No total, foram identificadas cento e vinte e nove espécies moleculares de lípidos polares no óleo de sementes da azeitona. A maioria das classes foi reportada nestas sementes pela primeira vez, nomeadamente os GLs MGDG, SQDG, SQMG, os PLs NAPE, os glucósidos ASG, e os esfingolípidos HexCer e Cer.

Num trabalho anterior, Montealegre *et al.* (2013) pretendiam identificar PLs no óleo de sementes de azeitona da variedade Arbequina de Toledo, Espanha (115). Para tal, usaram uma mistura de etanol/água para a extração dos PLs das sementes. De seguida, a técnica utilizada para a análise foi a eletroforese capilar não aquosa acoplada a ESI-MS. Os autores identificaram cinco classes de PLs, tais como PA, PI, PC, PG e LPA e no total quinze espécies moleculares (115). Quantificaram 88% de PA, 6% de PI, 4,4% de PC, 1,2% de PG e 0,2% de LPA (115). No presente trabalho e após quantificação de fósforo nas bandas de TLC, foram obtidos os seguintes resultados: 73,75% de PA, 9,57% de PI, 7,43% de PC, 2,10% de PG e 0,25% de PE. Comparando com o estudo de Montealegre *et al.* (2013), os valores de abundância relativa das classes de PLs são semelhantes. A análise da fração de lípidos polares por LC-MS torna-se mais vantajosa do que a técnica de TLC, pois foi possível identificar mais classes de lípidos polares, as suas estruturas por MS/MS e também confirmar a identidade de alguns compostos através da massa exata.

A presença de outras classes de lípidos polares, além de PLs, ainda não tinha sido reportada para o óleo de sementes de azeitona. No presente trabalho foram identificadas, pela primeira vez, na semente de azeitona Arbequina, cinco classes de GLs, uma classe de ASGs e duas classes de esfingolípidos. Comparando os resultados obtidos com trabalhos anteriores que analisaram o lipidoma polar de outras sementes de frutos, verificou-se que foram identificadas mais classes de PLs no óleo de sementes de azeitona Arbequina do que no óleo de sementes de abacate (112), nomeadamente as classes de LPC, NAPE, LPA, LPE e LPI (113). No que se refere à quantidade de GLs,

no óleo de sementes de azeitona foram identificadas mais três classes do que nos óleos de sementes de abacate (112) e melão (113), nomeadamente as classes de SQDG, SQMG e DGMG. O óleo de sementes de azeitona apresenta uma percentagem de 12,32% de DGDG, valor superior ao encontrado no óleo de sementes de abacate (1,7-2,0%) (112).

A fração polar do óleo de sementes de azeitona da variedade Arbequina contém 87,72% de PLs, 9,79% de GLs, 1,58% de esfingolípidos e 0,90% de ASGs com base nos dados de HPLC-MS (Tabela 21). Alves *et al.* (2019) quantificaram 71,69% de PLs, 25,44% de GLs, 2,33% de glicosfingolípidos e 0,54% de betaínas na fração de lípidos polares de polpa de azeitona da variedade Galega, com base na abundância relativa calculada a partir dos dados de HPLC-MS (138). Comparando os resultados obtidos nos dois trabalhos, foram identificadas, nas sementes de azeitona mas não na polpa, as classes de PA, LPA, PI, LPI, NAPE, LPE, SQDG, SQMG, Cer e ASG. Por outro lado, a polpa de azeitona apresentou as classes de SM, DGTS e MGTS, que não foram encontradas nas sementes e cuja presença está normalmente associada a microrganismos (122). A quantidade de GLs na polpa da azeitona é mais do dobro da quantidade encontrada na semente. Embora as matrizes sejam diferentes, e, por conseguinte, a sua composição possa ser diferente, na polpa da azeitona não foram identificadas as classes de lípidos aniónicos PA, PI, SQDG, nem as suas formas liso (138). A classe de PG foi encontrada numa percentagem residual (138). Este facto poderá dever-se a não terem sido utilizados eluentes acídicos no procedimento utilizado por Alves e coautores (2019) para o fracionamento do óleo da polpa da azeitona e para o enriquecimento da fração de lípidos polares com SPE-NH₂, tendo sido obtidos essencialmente os lípidos polares neutros e zwitteriónicos. Desta forma, o procedimento laboratorial desenvolvido nesta dissertação para a obtenção da fração enriquecida em compostos polares mostrou-se promissor e de grande relevância para o estudo do lipidoma polar de óleo de sementes de azeitona. Além disso, pode ser aplicado a outros óleos e extratos lipídicos de outras amostras de origem biológica e alimentar.

A análise do perfil de lípidos polares por HPLC-MS permitiu identificar uma ampla variedade de classes e espécies lipídicas, algumas das quais foram identificadas pela primeira vez no óleo de sementes de azeitona, tendo também permitido um melhor conhecimento do lipidoma deste óleo. As classes de PC e PE, encontradas na fração polar do óleo de sementes de azeitona, têm sido relatadas como tendo propriedades antioxidantes sinérgicas com fenóis neste tipo de matrizes (106–109). Estas classes de

PLs juntamente com as classes de PA e PI são os principais componentes das lecitinas, que são um subproduto isolado durante a extração de óleos alimentares e utilizados para várias aplicações em diversas indústrias (108). Este subproduto é um ingrediente importante de muitas fórmulas industriais de alimentos (111). As NAPEs foram descritas pela primeira vez, nas sementes de azeitona, neste trabalho. Esta classe lipídica está presente em todos os principais grupos de organismos, incluindo plantas, animais e alguns microrganismos (186). Em geral, a quantidade de NAPEs nos tecidos de plantas é relativamente pequena. Por exemplo, a NAPE é cerca de 2-3% do conteúdo total de PLs em plantas (186). Alguns estudos indicaram que as NAPEs desempenham um papel duplo nas plantas, como precursor direto da via de sinalização de *N*-acil-etanolaminas (NAEs) e como componente estabilizador de membranas de duas camadas (187). Além disso, alguns autores utilizaram uma estirpe de *E. coli* para produzir NAPEs e demonstraram que a incorporação dessas bactérias terapeuticamente modificadas no intestino retarda o desenvolvimento da obesidade e da intolerância à glucose, em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura (188). As NAPEs são normalmente sintetizadas por enterócitos do intestino delgado em resposta à alimentação. No entanto, uma dieta rica em gordura prejudica a biossíntese intestinal das NAPEs (189). Os autores concluíram que as NAPEs sintetizadas por bactérias poderiam ser usadas para compensar a síntese reduzida de NAPE (190). Além disso, a incorporação de bactérias que expressem NAPEs no intestino mostrou ser mais eficaz do que administração oral de NAPE purificada (191).

As classes de GLs como MGDG, DGDG e SQDG têm sido associados a ações benéficas, tais como funções potencialmente anti-tumorais, incluindo a inibição da polimerase de ADN e a supressão da proliferação de células tumorais (119). Além disso, o MGDG apresenta maior atividade anti-tumoral e anti-inflamatória do que os outros GLs (120). Os esfingolípídeos têm um papel importante na pele. As HexCer são componentes fundamentais da estrutura lamelar que medeiam a função da permeabilidade epidérmica e a homeostase da pele (123–125). Por outro lado, a Cer ajuda a melhorar e manter a função da barreira da epiderme (132). Os ASGs são componentes dietéticos eficazes na redução do colesterol e a sua ingestão pode ajudar, em parte, na redução do risco de doenças cardiovasculares (133).

A determinação das MICs pelo ensaio da microdiluição em caldo permitiu testar a atividade antimicrobiana de padrões de lípidos polares e de frações enriquecidas em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona contra a bactéria MRSA. Os padrões de

lípidos não apresentaram atividade antimicrobiana, nas concentrações testadas. O padrão de PE nas concentrações intermédias (0,62, 0,31 e 0,16 mg mL⁻¹, Figura 25), mostrou um efeito “protetor” da inibição do crescimento bacteriano relativamente aos outros lípidos, pois a sua presença não foi inibida pela presença do DMSO. Este efeito terá que ser novamente testado, de forma a averiguar uma influência efetiva na proteção da bactéria. No que diz respeito aos extratos lipídicos do óleo de sementes de azeitona, também não apresentaram atividade contra a MRSA nas concentrações testadas.

A atividade antimicrobiana de extratos de plantas (Amaranthaceae) e de extratos de ASGs obtidos a partir dessas plantas foi testada por Salvador *et al.* (2002) utilizando várias bactérias, inclusive *S. aureus* (166). Os autores determinaram MICs através de antibiogramas em meio de cultura sólido e verificaram que a mistura de ASGs era ativa contra as duas estirpes de *S. aureus* (ATCC 25923 e 7+), com uma MIC de 50 µg mL⁻¹ para ambas (166). No presente trabalho, o padrão de ASG testado contra a MRSA (estirpe DMS 25693) não apresentou nenhum efeito contra a bactéria nas concentrações testadas, com o método da microdiluição. Bibel *et al.* (1992) demonstraram a atividade antimicrobiana de esfingosinas e PLs em diferentes estirpes de *S. aureus*. Estes autores verificaram que, numa concentração de 200 µg mL⁻¹, o PA, o éster monometílico do PA, a PE e a PC são ineficazes contra a bactéria, com uma redução de 0,5 log CFU mL⁻¹. No entanto, a β-oleoil-γ-palmitoil-PE reduziu 1,0 log CFU mL⁻¹ a 200 µg mL⁻¹ (25 µM). Por outro lado, os galactocerebrósidos (glicosil-esfingosinas) foram ineficazes e a oleoil-esfingosina foi inibitória em concentrações superiores a 25 µg mL⁻¹ (167). A atividade das esfingosinas também foi relatada em *S. aureus*, nomeadamente esfingosina, esfinganina e hidroxí-esfinganina. Todas as esfingosinas apresentaram uma redução da viabilidade celular bacteriana de 4,5 log CFU mL⁻¹ a 12,5 µg mL⁻¹. A atividade da esfingosina foi significativamente superior à dos outros lípidos (167).

Em estudos de lipidómica, foi possível mostrar que as principais classes de PLs em espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa são PGs e CLs (192). Também foram encontradas, neste tipo de bactérias, pequenas quantidades de outros PLs como lisil-PGs catiónicos (abundantes em MRSA), PAs, MGDG, DGDG e outros PLs não identificados (193,194). Num estudo com diferentes estirpes de MRSA, as principais classes de PLs identificadas foram: PGs (57 a 83%), LPG (7 a 25%), e CLs (3 a 15%) (195). Portanto, a quantidade de PLs da membrana é qualitativamente e quantitativamente diferente entre as espécies de *Staphylococcus* e, desse modo, essas

espécies nem sempre respondem do mesmo modo à ação dos agentes antimicrobianos (195).

Por outro lado, a função dos lípidos nas bactérias ainda não está totalmente compreendida e, sendo componentes estruturais das membranas, afetam as suas propriedades físicas. A adição de lípidos ou um excesso destes compostos em bactérias, por exemplo, por adição de extratos lipídicos, nomeadamente lípidos presentes na sua composição, em vez de um efeito nocivo, pode significar que eles sejam incorporados nas bactérias e alterem as propriedades das membranas. Verificou-se esse facto em *E. coli*, em que a acumulação de PA na bactéria aumentava a sua resistência à vancomicina (196). Estudos com bactérias também demonstraram que a PE é um PL que influencia a topologia e função membranar, influenciando a organização das proteínas de membrana (197). A PE é um lípido em forma de cone, o que significa que o seu grupo cabeça ocupa um volume significativamente inferior ao das suas cadeias acil hidrofóbicas. Concentrações molares elevadas de lípidos em forma de cone não são propícias à formação de superfícies estáveis da membrana lamelar, uma vez que a forma do cone força a membrana a novas arquiteturas ou, então, expõe o núcleo hidrofóbico da membrana (198). O contacto das bactérias com solventes orgânicos, como o etanol, e a acumulação desses solventes orgânicos na bicamada lipídica pode aumentar a distância entre os lípidos na bicamada (199). Essas alterações dos PLs irão afetar a densidade de carga superficial da membrana, aumentando a área superficial dos lípidos (199). Da mesma forma que para o etanol, o mesmo poderá acontecer com o DMSO, o veículo utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana durante este trabalho. Em *E. coli*, PE e a PC não mostraram efeito na resistência celular ao etanol mas a PS, presente na membrana citoplasmática, neutralizou o efeito do etanol e proporcionou menor sensibilidade a este solvente orgânico (199). A presença simultânea de DMSO e de um excesso de PE em MRSA, como testado neste trabalho, poderá dar origem a uma resposta específica que necessita de ser melhor estudada. A explicação para a resistência bacteriana ao stress exógeno é um aumento na proporção de PLs aniónicos/zwitteriónicos (200).

A atividade antimicrobiana de extratos de lípidos polares obtidos a partir de óleo de sementes de azeitona foi reportada pela primeira vez neste trabalho. Uma vez que foram realizados apenas ensaios preliminares, pretende-se futuramente avaliar a atividade destes extratos de forma a valorizar este óleo não só como alimento, mas também como ingrediente para formulações terapêuticas das indústrias farmacêutica e cosmeceutica,

dado que contém na sua composição lípidos polares com atividade antimicrobiana reportada para outras estirpes bacterianas.

Esta informação poderá ser importante na elaboração de novos produtos alimentares, como óleos em que o de sementes de azeitona seja matéria-prima, aperitivos, farinhas, etc., elaborados com e/ou a partir das sementes da azeitona, baseados nos seus componentes lipídicos bioativos. Desta forma, estes compostos podem ser explorados nas indústrias que utilizam azeitonas e seus derivados como matérias-primas, como nas indústrias nutracêutica, cosmética, farmacêutica e de ração animal.

5. Conclusão

O óleo de sementes de azeitona é uma fonte de lípidos com valor nutricional e potencial para uso em diversas indústrias. É um óleo rico em triacilgliceróis cujos ácidos gordos incluem maioritariamente ácidos monoinsaturados $n-9$ e polinsaturados $n-6$, e uma pequena porção de $n-3$, cuja ingestão está associada à diminuição de fatores de risco de doença cardiovascular. Além disso, o óleo de sementes de azeitona tem baixos índices de aterogenicidade e trombogenicidade, atuando como um alimento protetor na prevenção de doenças coronárias. A caracterização do lipidoma polar foi obtida através da lipidómica baseada em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução, com um processo de fracionamento otimizado capaz de recuperar a totalidade dos lípidos polares. O lipidoma polar inclui cento e vinte e nove espécies moleculares, compreendendo fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos e esteróis glicosilados acilados com ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados na sua composição, incluindo ácidos gordos essenciais $18:2n-6$ e $18:3n-3$. Vários destes compostos polares são conhecidos pela sua atividade biológica *in vitro* e *in vivo*. Os extratos lipídicos ricos em lípidos polares do óleo de sementes de azeitona não evidenciaram atividade antibacteriana nas concentrações e com o método testado. Futuramente, pretende-se avaliar em maior detalhe a atividade antimicrobiana destes extratos e também outras atividades biológicas de forma a valorizar as sementes como um subproduto agro-industrial, e ingrediente ou matéria-prima, como nas indústrias alimentar, nutracêutica, cosmética, farmacêutica e de ração animal.

6. Referências bibliográficas

1. Ordoudi SA, Bakirtzi C, Tsimidou MZ. The potential of tree fruit stone and seed wastes in Greece as sources of bioactive ingredients. *Recycling*. 2018;3(1):9.
2. Mamma D, Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P. Biotechnological potential of fruit processing industry residues. In: P. Singh-Nee Nigam, A. Pandey (eds.) *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Springer; 2009. p. 273–91.
3. Matthäus B, Musazcan Özcan M. Oil Content, Fatty acid composition and distributions of vitamin-E-active compounds of some fruit seed oils. *Antioxidants*. 2015;4:124–33.
4. Albuquerque TG, Silva MA, Oliveira BP, Costa HS. Edible seeds: fatty acids composition and potential health impact. Instituto Nacional de Saúde, Boletim Epidemiológico. 2016; número especial 8, 2ª série:12-6.
5. Bozan B, Temelli F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*. 2008;99:6354–9.
6. Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive Liver Disease*. 2002;34:S105–10.
7. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*. 2009;59(6):365–78.
8. Bernal J, Mendiola JA, Ibáñez E, Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;55(4):758–74.
9. Shahidi F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends in Food Science and Technology*. 2009;20(9):376–87.
10. Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*. 2007;68(22-24):2986–3008.
11. Raihana ARN, Marikkar JMN, Amin I, Shuhaimi M. A review on food values of selected tropical fruits' seeds. *International Journal of Food Properties*. 2015;18(11):2380–92.
12. Górnas P, Rudzinska M. Seeds recovered from industry by-products of nine fruit species with a high potential utility as a source of unconventional oil for biodiesel

- and cosmetic and pharmaceutical sectors. *Industrial Crops and Products*. 2016;83:329–38.
13. Alves E, Domingues M, Domingues P. Polar lipids from olives and olive oil: A review on their identification, significance and potential biotechnological applications. *Foods*. 2018;7(7):109.
 14. Değirmencioglu N. Chapter 12 - Modern techniques in the production of table olives. In: Clodoveo M, Boskou D (eds.) Products from olive tree. *InTechOpen*; 2016. P. 215-234. DOI: 10.5772/64988. Available from: <https://www.intechopen.com/books/products-from-olive-tree/modern-techniquesin-the-production-of-table-olives> [Accessed 6th October 2018].
 15. International Olive Council. *World Olive Oil Figures* [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 12]. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>
 16. International Olive Council. *World Table Olive Figures* [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 12]. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>
 17. Olive Oil Market. *The Portuguese Sector Olive* [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 14]. Available from: <https://www.oliveoilmarket.eu>
 18. Olive oils from Spain. *The importance of the varieties* [Internet]. [cited 2018 Dec 13]. Available from: <https://www.oliveoilsfromspain.org/importance-varieties>
 19. Olint Plantas da Oliveira. *Arbequina AS-1* [Internet]. [cited 2018 Dec 14]. Available from: <http://www.olint.com/pt-br/oliva-cultivo-variedades/arbequina-1>
 20. Alva Oliva. *Aceite de Oliva Virgen Extra* [Internet]. [cited 2018 Dec 13]. Available from: <http://www.alvaoliva.com/en/arbequina.php>
 21. Vossen P. Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience*. 2007;42(5):1093–100.
 22. Sebadelhe CSM. Contribuição do sector do azeite para a produção de biodiesel. Tese de Mestrado. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa; 2008. Disponível em: https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/510/1/tese%20final%C3%ADssimo_25-08_alterado.pdf.
 23. The American Society of Mechanical Engineers. *Burning Olive Pits* [Internet]. [cited 2019 Jan 01]. Available from: <https://www.asme.org/engineering-topics/articles/renewable-energy/burning-olive-pits>

24. Olive Oil Times. *Are Olive Seeds the Next Superfood?* [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 12]. Available from: <https://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-business/olive-seeds-next-superfood/54716>
25. Rodríguez G, Lama A, Rodríguez R, Jiménez A, Guillén R, Fernández-Bolaños J. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*. 2008;99(13):5261–9.
26. Copeland LO, McDonald MF. *Principles of seed science and technology*. 4th ed. Science & Business Media; 2012. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=M3jgBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR8&dq=Copeland+LO,+McDonald+MF.+Principles+of+seed+science+and+technology.+Springer+Science+%26+Business+Media%3B+2012.+&ots=0C6KLIKCK9&sig=IPTz92f3wQYGSErxHI Oh4O1fDw0#v=onepage&q&f=false> [Accessed 22th January 2019].
27. Kamel BS, Kakuda Y. Characterization of the seed oil and meal from apricot, cherry, nectarine, peach and plum. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1992;69(5):492–4.
28. Bianchi G. Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2003;105(5):229–42.
29. Maestro Duran R. Relationship between the composition and ripening of the olive and quality of the oil. In: Rallo L, Caballero JM, Fernández-Escobar R (eds.) *International Symposium on Olive Growing*. 286. 1989. p. 441–52.
30. Maestri D, Barrionuevo D, Bodoira R, Zafra A, Jiménez-López J, de Dios Alché J. Nutritional profile and nutraceutical components of olive (*Olea europaea* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology*. 2019;56(9):4359–370.
31. Moussaoui R, Labbaci W, Hemar N, Youyou A, Amir Y. Physico-chemical characteristics of oils extracted from three compartments of the olive fruit (pulp, endocarp and seed) of variety Chemlal cultivated in Kabylia (Algeria). *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 2008;6(2):52-5.
32. Bora PS, Narain N, Rocha RVM, Paulo MQ. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y aceites*. 2001;52(3-4):171–4.
33. Shahidi F. *Nutraceutical and specialty lipids and their co-products*. Boca Raton: CRC Press; 2006.

34. Schinas P, Karavalakis G, Davaris C, Anastopoulos G, Karonis D, Zannikos F, et al. Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil as an alternative feedstock for the production of biodiesel in Greece. *Biomass and Bioenergy*. 2009;33(1):44–9.
35. Fazio A, Plastina P, Meijerink J, Witkamp RF, Gabriele B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chemistry*. 2013;140(4):817–24.
36. Coşkuner Y n, Tekin A. Monitoring of seed composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L) fruits during maturation period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2003;83(8):846–9.
37. Piombo G, Barouh N, Barea B, Boulanger R, Brat P, Pina M, et al. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 2006;13(2-3):195–9.
38. Ajewole K, Adeyeye A. Characterisation of Nigerian citrus seed oils. *Food Chemistry*. 1993;47(1):77–8.
39. Yukui R, Wenya W, Rashid F, Qing L. Fatty acids composition of apple and pear seed oils. *International Journal of Food Properties*. 2009;12:774–9.
40. Xiuzhu Y, Zhixi L, Shuangkui D. Ultrasonic extraction of apple seed oil and its physical-chemical properties. *Transactions from the Chinese Society of Agricultural*. 2005;9:33.
41. Li ZX, Li YR, Yu XZ, Du SK, Shi YG. Physicochemical properties of apple seed and its oil. *Chinese Fats*. 2005;30(11):71–3.
42. Lu Y, Foo LY. Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chemistry*. 1998;61(1-2):29–33.
43. Kittiphoom S. Utilization of mango seed. *International Food Reserarch* 2012;19(4):1325-35.
44. Moaddabdoost Baboli Z, Safe Kordi AA. Characteristics and composition of watermelon seed oil and solvent extraction parameters effects. *Journal of the American Oil Chemistis´ Society*. 2010;87(6):667–71.
45. Gustinelli G, Eliasson L, Svelander C, Alminger M, Ahrné L. Supercritical CO₂ extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) seed oil: Fatty acid composition and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018;135:91–7.

46. Puangsri T, Abdulkarim SM, Ghazali HM. Properties of *Carica papaya* L. (papaya) seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods. *Journal of Food Lipids*. 2005;12(1):62–76.
47. Lee W, Lee M, Su N. Characteristics of papaya seed oils obtained by extrusion–expelling processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011;91(13):2348–54.
48. Melgarejo P, Salazar DM, Amoros A, Artes F. Total lipids content and fatty acid composition of seed oils from six pomegranate cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1995;69(2):253–6.
49. Passos CP, Yilmaz S, Silva CM, Coimbra MA. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry*. 2009;115(1):48–53.
50. Rustan AC, Drevon CA. Fatty acids: structures and properties. In: eLS (eds.) Jhon Wiley & Sons; 2005. doi:10.1038/npg.els.0003894
51. Sakouhi F, Herchi W, Sebei K, Absalon C, Kallel H, Boukhchina S. Accumulation of total lipids, fatty acids and triacylglycerols in developing fruits of *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*. 2011;132:7–11.
52. Ngo-Duy C, Destailats F, Keskitalo M, Arul J, Angers P. Triacylglycerols of Apiaceae seed oils: composition and regiodistribution of fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2009;111(2):164–9.
53. Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *Journal of Lipid Research*. 1985;26(2):194–202.
54. Youzbachi N, Trabelsi H, Elfalleh W, Khaldi A, Nasri N, Tlili N. Fatty acids and triacylglycerols composition from Tunisian *Acacia* species seed oil. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015.
55. Ward OP, Singh A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*. 2005;40(12):3627–52.
56. Hornstra G, Lussenburg RN. Relationship between the type of dietary fatty acid and arterial thrombosis tendency in rats. *Atherosclerosis*. 1975;22(3):499–516.
57. McGregor L, Morazain R, Renaud S. A comparison of the effects of dietary short and long chain saturated fatty acids on platelet functions, platelet phospholipids, and blood coagulation in rats. *Laboratory Investigation*. 1980;43(5):438–42.

58. MacIntyre DE, Hoover RL, Smith M, Steer M, Lynch C, Karnovsky MJ, et al. Inhibition of platelet function by *cis*-unsaturated fatty acids. *Blood*. 1984;63(4):848–57.
59. Renaud S, Morazain R, Godsey F, Dumont E, Thevenon C, Martin JL, et al. Nutrients, platelet function and composition in nine groups of French and British farmers. *Atherosclerosis*. 1986;60(1):37–48.
60. Ferreira J. Fundação Portuguesa de Cardiologia [Internet]. *Ómeegas 3 e 6* [cited 2019 Nov 10]. Available from: <http://www.fpcardiologia.pt/omegas-3-e-6/>
61. Ulbricht TL V, Southgate DAT. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*. 1991;338(8773):985–92.
62. Grundy SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *The New England Journal of Medicine*. 1986;314(12):745–8.
63. Shepherd J, Packard CJ, Patsch JR, Gotto AM, Taunton OD. Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high density lipoproteins and the metabolism of apolipoprotein AI. *Journal of Clinical Investigation*. 1978;61(6):1582–92.
64. Saynor R, Gillott T. Fish oil and plasma fibrinogen. *British Medical Journal*. 1988;297(6657):1196.
65. Wardlaw GM, Snook JT. Effect of diets high in butter, corn oil, or high-oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1990;51(5):815–21.
66. Mensink RP, Katan MB. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *The New England Journal of Medicine*. 1989;321(7):436–41.
67. Lodén M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2003;4(11):771–88.
68. Lin M-H, Khnykin D. Fatty acid transporters in skin development, function and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014;1841(3):362–8.
69. Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985;13(5):701–25.

70. Cardoso CR, Souza MA, Ferro EA, Favoreto S Jr, Pena JD. Influence of topical administration of *n*-3 and *n*-6 essential and *n*-9 non-essential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair and Regeneration*. 2004;12(2):235–43.
71. Bianchi G, Vlahov G. Composition of lipid classes in the morphologically different parts of the olive fruit, cv. Coratina (*Olea europaea* Linn.). *Lipid/Fett*. 1994;96(2):72–7.
72. Oomah BD, Ladet S, Godfrey D V, Liang J, Girard B. Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*. 2000;69(2):187–93.
73. Malacrida CR, Jorge N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and chemical characteristics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012;55:127–34.
74. Milovanović M, Pićurić-Jovanović K. Characteristics and composition of melon seed oil. *Journal of Agricultural Science*. 2005;50(1):41–7.
75. Nehdi I, Omri S, Khalil MI, Al-Resayes SI. Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. *Industrial Crops and Products*. 2010;32:360–5.
76. Alves E, Rey F, Costa E da, Moreira ASP, Pato L, Pato L, et al. Olive (*Olea europaea* L. cv. *Galega vulgar*) seed oil: A first insight into the major lipid composition of a promising agro-industrial by-product at two ripeness stages. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2018;120(4):1700381.
77. Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Di Loreto G, Iannucci E, Lucera L, et al. Acylglycerol and fatty acid components of pulp, seed, and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(13):3775–9.
78. Lung S, Weselake RJ. Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids*. 2006;41(12):1073–88.
79. Aparicio R, Aparicio-Ruíz R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*. 2000;881(1-2):93–104.
80. The Lipid Web . Triacylglycerols: 1. Structure and Composition [Internet]. [cited 2018 Nov 13]. Available from: <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/tag1/index.htm>

81. Mu H, Høy C-E. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*. 2004;43(2):105–33.
82. Hamilton RJ, Kalu C, Prisk E, Padley FB, Pierce H. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*. 1997;60(2):193–9.
83. Potočnik T, Ogrinc N, Potočnik D, Košir IJ. Fatty acid composition and $\delta^{13}\text{C}$ isotopic ratio characterisation of pumpkin seed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016;53:85–90.
84. Kiran U, Prajapati TR. Study of fatty acid composition of fruit seed oils. *International Journal of Academic Research and Development*. 2017;2(5):36-40
85. Lutterodt H, Slavin M, Whent M, Turner E, Yu LL. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*. 2011;128(2):391-9.
86. Samaram S, Mirhosseini H, Tan CP, Ghazali HM. Ultrasound-assisted extraction (UAE) and solvent extraction of papaya seed oil: Yield, fatty acid composition and triacylglycerol profile. *Molecules*. 2013;18:12474–87.
87. Nehdi I, Omri S, Khalil MI, Al-Resayes SI. Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. *Industrial Crops and Products*. 2010;32(3):360–5.
88. Bada JC, León-Camacho M, Copovi P, Alonso L. Characterization of apple seed oil with Denomination of Origin from Asturias, Spain. *Grasas y Aceites*. 2014;65(2):27.
89. Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2008;108(3):1122–32.
90. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi A. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(7):939-66.
91. Wojciechowski ZA. Biochemistry of phytosterol conjugates. *Physiology and Biochemistry of Sterols*. 1992;361–95.
92. Ambrosewicz-Walacik M, Tańska M, Rotkiewicz D. Phospholipids of rapeseeds and rapeseed oils: Factors determining their content and technological significance - A review. *Food Reviews International*. 2015;31(4):385–400.
93. Akoh CC. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 4nd ed. Boca Raton: CRC press; 2017. Available from:

- <https://www.taylorfrancis.com/books/9781315151854> [Accessed 30th March 2019].
94. Boukhchina S, Sebai K, Cherif A, Kallel H, Mayer PM. Identification of glycerophospholipids in rapeseed, olive, almond, and sunflower oils by LC MS and LC MS MS. *Canadian Journal of Chemistry*. 2004;82(7):1210–5.
 95. Salas JJ, Martínez-Force E, Garcés R. Accumulation of phospholipids and glycolipids in seed kernels of different sunflower mutants (*Helianthus annuus*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2006;83(6):539–45.
 96. Alves E, Melo T, Rey F, Moreira ASP, Domingues P, Domingues MR. Polar lipid profiling of olive oils as a useful tool in helping to decipher their unique fingerprint. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;74:371–7.
 97. Han P, Yuan Y. Lipidomic analysis reveals activation of phospholipid signaling in mechanotransduction of *Taxus cuspidata* cells in response to shear stress. *FASEB Journal*. 2009;23(2):623–30.
 98. Kerr WG, Colucci F. Inositol phospholipid signaling and the biology of natural killer cells. *Journal of Innate Immunity*. 2011;3(3):249–57.
 99. Munnik T, Testerink C. Plant phospholipid signaling: “in a nutshell.” *Journal of Lipid Research*. 2009;50(Supplement):S260–5.
 100. Tzen JTC, Cao YZ, Laurent P, Ratnayake C, Huang AHC. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiology*. 1993;101(1):267–76.
 101. Küllenberg D, Taylor LA, Schneider M, Massing U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids in Health and Disease*. 2012;11(1):3.
 102. Restuccia D, Spizzirri UG, Puoci F, Cirillo G, Vinci G, Picci N. Determination of phospholipids in food samples. *Food Reviews International*. 2012;28(1):1–46.
 103. Eckhardt ER, Wang DQH, Donovan JM, Carey MC. Dietary sphingomyelin (SM) significantly inhibits intestinal cholesterol (Ch) absorption by lowering thermodynamic activity (TA) of Ch in bile salt (BS) mixed micellar solution. *Gastroenterology*. 2001;120(5):A679–80.
 104. Pepeu G, Pepeu IM, Amaducci L. A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects. Is phosphatidylserine a drug for the ageing brain? *Pharmacological Research*. 1996;33(2):73–80.

105. Sun N, Chen J, Wang D, Lin S. Advance in food-derived phospholipids: Sources, molecular species and structure as well as their biological activities. *Trends in Food Science and Technology*. 2018;60:199-211.
106. Weng, X. C., & Gordon, M. H. (1993). Antioxidant synergy between phosphatidyl ethanolamine and α -tocopherylquinone. *Food Chemistry*. 1993; 48(2), 165–168.
107. Doert M, Krüger S, Morlock GE, Kroh LW. Synergistic effect of lecithins for tocopherols: formation and antioxidant effect of the phosphatidylethanolamine - L-ascorbic acid condensate. *European Food Research and Technology*. 2017;243(4):583–96.
108. Doert M, Jaworska K, Moersel J-T, Kroh LW. Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of α -tocopherol. *European Food Research and Technology*. 2012;235(5):915–28.
109. Cui L, McClements DJ, Decker EA. Impact of phosphatidylethanolamine on the antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in bulk oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(12):3288–94.
110. Smith J, Hong-Shum L. *Food additives data book*. 2nd ed. Blackwell Publishing Ltd.; 2011. Available from: https://ceti-quimica2.files.wordpress.com/2015/09/f00d_4dd1t1v35_d4t4_800k.pdf [Accessed 20th March 2019]
111. Szuhaj BF. Molecular Nutrition. *Lecithins: sources, manufacture & uses*. The American Oil Chemists Society; 1989. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/food.19900340429> [Accessed 20th March 2019]
112. Takenaga F, Matsuyama K, Abe S, Torii Y, Itoh S. Lipid and fatty acid composition of mesocarp and seed of avocado fruits harvested at northern range in Japan. *Journal of Oleo Science*. 2008;57(11):591–7.
113. Hemavatahy J. Lipid composition of melon (*Cucumis melo*) kernel. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1992;5(1):90–5.
114. Vieira P, Melo T, da Costa E, Domingues P, Domingues R, Alves E. Olive seed lipids as promising ingredients from agri-food industrial by-products [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 20]. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Eliana_Alves/publication/326147939_Olive_seed_lipids_as_promising_ingredients_from_agri-food_industrial_by-

- products/links/5b3b499da6fdcc8506eaab85/Olive-seed-lipids-as-promising-ingredients-from-agri-food-industrial-by-products.pdf
115. Montealegre C, Sánchez-Hernández L, Crego AL, Marina ML. Determination and characterization of glycerophospholipids in olive fruit and oil by nonaqueous capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(8):1823–32.
 116. Study.com. Glycolipids: Definition, Function & Structure [Internet]. [cited 2019 Jan 01]. Available from: <https://study.com/academy/lesson/glycolipids-definition-function-structure.html>
 117. Akasaka H, Mizushima Y, Yoshida K, Ejima Y, Mukumoto N, Wang T, et al. MGDG extracted from spinach enhances the cytotoxicity of radiation in pancreatic cancer cells. *Radiation Oncology*. 2016;11(1):153.
 118. Maeda N, Yoshida H, Mizushima Y. Bioactive foods in promoting health. In: Watson RR, Preedy, VR. (eds.) *Chapter 26 - Spinach and health: anticancer effect*. Academic Press; 2010. p. 393–405.
 119. Maeda N, Kokai Y, Ohtani S, Sahara H, Kumamoto-Yonezawa Y, Kuriyama I, et al. Anti-tumor effect of orally administered spinach glycolipid fraction on implanted cancer cells, colon-26, in mice. *Lipids*. 2008;43(8):741.
 120. Maeda N, Matsubara K, Yoshida H, Mizushima Y. Anti-cancer effect of spinach glycolipids as angiogenesis inhibitors based on the selective inhibition of DNA polymerase activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011;11(1):32–8.
 121. Pacetti D, Boselli E, Lucci P, Frega NG. Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography A*. 2007;1150(1-2):241–51.
 122. Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ. The lipid handbook. 3rd ed. Boca Raton: CRC press; 2007. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=INZa6WmqDA8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Gunstone+FD,+Harwood+JL,+Dijkstra+AJ.+The+lipid+handbook+with+CD-ROM.+CRC+press%3B+2007.+&ots=Su8w8h4Er8&sig=sVf_PQZ8qFtujp7dF1iKoc4WYko#v=onepage&q=Gunstone%20FD%2C%20Harwood%20JL%2C%20Dijkstra%20AJ.%20The%20lipid%20handbook%20with%20CD-ROM.%20CRC%20press%3B%202007.&f=false. [Accessed 20th April 2019].

123. Imokawa G, Kuno H, Kawai M. Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990;96(6):845–51.
124. Hamanaka S, Nakazawa S, Yamanaka M, Uchida Y, Otsuka F. Glucosylceramide accumulates preferentially in lamellar bodies in differentiated keratinocytes. *British Journal of Dermatology*. 2005;152(3):426–34.
125. Hamanaka S, Suzuki A, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Uchida Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *Journal of Investigative Dermatology*. 2002;119(2):416–23.
126. Vesper H, Schmelz E-M, Nikolova-Karakashian MN, Dillehay DL, Lynch D V, Merrill Jr AH. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *Journal of Nutrition*. 1999;129(7):1239–50.
127. Sugawara T, Kinoshita M, Ohnishi M, Nagata J, Saito M. Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*. 2003;133(9):2777–82.
128. Schmelz E-M, Crall KJ, Larocque R, Dillehay DL, Merrill Jr AH. Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *Journal of Nutrition*. 1994;124(5):702–12.
129. Nilsson Å. Metabolism of cerebroside in the intestinal tract of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1969;187(1):113–21.
130. Nilsson A. Metabolism of sphingomyelin in the intestinal tract of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1968;164:575–84.
131. Merrill Jr AH, Schmelz E-M. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. In: Wolinsky I. (ed.) *Sphingolipids: mechanism-based inhibitors of carcinogenesis produced by animals, plants, and other organisms*. Boca Raton: CRC Press; 2002. p. 399–414.
132. Tsuji K, Mitsutake S, Ishikawa J, Takagi Y, Akiyama M, Shimizu H, et al. Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice. *Journal of Dermatological Science*. 2006;44(2):101–7.
133. Nyström L, Schär A, Lampi A. Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2012;114(6):656–69.
134. Frasch W, Grunwald C. Acylated steryl glycoside synthesis in seedlings of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology*. 1976;58(6):744–8.

135. Warnecke D, Erdmann R, Fahl A, Hube B, Müller F, Zank T, et al. Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(19):13048–59.
136. Lin X, Ma L, Moreau RA, Ostlund RE. Glycosidic bond cleavage is not required for phytosteryl glycoside-induced reduction of cholesterol absorption in mice. *Lipids*. 2011;46(8):701–8.
137. Bianco A, Mazzei RA, Melchioni C, Scarpati ML, Romeo G, Uccella N. Microcomponents of olive oil. Part II: Digalactosyldiacylglycerols from *Olea europaea*. *Food Chemistry*. 1998;62(3):343–6.
138. Alves E, Melo T, Barros MP, Domingues MRM, Domingues P. Lipidomic profiling of the olive (*Olea europaea* L.) fruit towards its valorisation as a functional food: In-depth identification of triacylglycerols and polar lipids in portuguese olives. *Molecules*. 2019;24(14):2555.
139. Brum AAS. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. Tese de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-26042005-141101/en.php>
140. Domingues P, García A, Skrzydlewska E, Łuczaj W, Gęgotek A, Bielawska K, et al. AACLifeSci Course Companion Manual Advanced Analytical Chemistry for Life Sciences. 2018. Available from: https://www.umb.edu.pl/photo/pliki/projekty_umb/aac/aaclifesci_-_manual.pdf. [Accessed 20th June 2019]
141. The Global Home of Chemical Engineers (AIChE). Design Principles for Liquid-Liquid Extraction [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 26]. Available from: <https://www.aiche.org/resources/publications/cep/2015/november/design-principles-liquid-liquid-extraction>
142. Bouazzaoui N, Bouajila J, Camy S, Mulengi JK, Condoret J-S. Fatty acid composition, cytotoxicity and anti-inflammatory evaluation of melon (*Cucumis melo* L. *Inodorus*) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Separation Science and Technology*. 2018;53(16):2622–7.
143. AFFINISEP. Solid Phase Extraction [Internet]. [cited 2018 Dec 26]. Available from: <https://www.affinisep.com/technology/solid-phase-extraction/>

144. UCLA College – Chemistry & Biochemistry. Thin-layer Chromatography [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 27]. Available from: <https://www.chem.ucla.edu/~bacher/General/30BL/tips/TLC1.html>
145. Chemguide. Thin layer chromatography [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 27]. Available from: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html>
146. Vieira P, Sousa J, Alves E. Caracterização lipídica de sementes de azeitona para a sua valorização como subproduto da indústria de azeite e de azeitona de mesa [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 01]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/326147914_Caracterizacao_lipidica_de_sementes_de_zeitona_para_a_sua_valorizacao_como_subproduto_da_industria_de_zeite_e_de_zeitona_de_mesa
147. Thermo Fischer Scientific. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) Information [Internet]. [cited 2018 Dec 20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html>
148. AGA – A Member of the Linde Group. Gas Chromatography-Flame Ionization Detector [Internet]. [cited 2018 Dec 20]. Available from: http://www.aga.is/is/images/AGA_HIQ_Flame_Ionization_Detector_Datasheet_UK_tcm648-102263.pdf
149. The Linde Group. High-performance liquid chromatography (HPLC) [Internet]. [cited 2018 Dec 27]. Available from: http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html
150. Sucupira NR, da Silva AB, Pereira G, da Costa JN. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *Journal of Health Sciences*. 2012;14(4):263-9.
151. Prado A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Tese de Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-09112009-135846/pt-br.php>
152. Kagliwal LD, Patil SC, Pol AS, Singhal RS, Patravale VB. Separation of bioactives from seabuckthorn seeds by supercritical carbon dioxide extraction

- methodology through solubility parameter approach. *Separation and Purification Technology*. 2011;80(3):533–40.
153. Walia M, Rawat K, Bhushan S, Padwad YS, Singh B. Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94:929–34.
 154. Tian H-L, Zhan P, Li K-X. Analysis of components and study on antioxidant and antimicrobial activities of oil in apple seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2010;61(4):395–403.
 155. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258(5090):1898–902.
 156. Abdullah A-SH, Mohammed AS, Abdullah R, Mirghani MES, Al-Qubaisi M. Cytotoxic effects of *Mangifera indica* L. kernel extract on human breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines) and bioactive constituents in the crude extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;14(1):199.
 157. McKinnon PS, Davis SL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *European Journal of Clinical Microbiology*. 2004;23(4):271–88.
 158. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008;3(2):163.
 159. Reichmann NT, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;319(2):97–105.
 160. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 2002;71(1):635–700.
 161. Sohlenkamp C, Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;40(1):133–59.
 162. White DC, Frerman FE. Extraction, characterization, and cellular localization of the lipids of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1967;94(6):1854–67.
 163. Oku Y, Kurokawa K, Ichihashi N, Sekimizu K. Characterization of the *Staphylococcus aureus* mprF gene, involved in lysinylation of phosphatidylglycerol. *Microbiology*. 2004;150(1):45–51.

164. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15(41):1-9. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19688>
165. Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from various skin diseases. *Journal of International Medical Research.* 2000;28(4):187–90.
166. Salvador MJ, Ferreira EO, Pral EMF, Alfieri SC, Albuquerque S de, Ito IY, et al. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine.* 2002;9(6):566–71.
167. Bibel DJ, Aly R, Shinefield HR. Antimicrobial activity of sphingosines. *Journal of Investigative Dermatology.* 1992;98(3):269–73.
168. Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970;5(5):494-496.
169. Brückner J. Estimation of monosaccharides by the orcinol–sulphuric acid reaction. *Biochemical Journal.* 1955;60(2):200.
170. Cyberlipid Center [Internet]. Quantitative determination of glycolipids. 2019 [cited 2019 Sep 18]. Available from: <http://cyberlipid.gerli.com/techniques-of-analysis/analysis-of-complex-lipids/glycosphingolipid-analysis/sugar-moiety/>
171. Bell BM, Daniels DGH, Fearn T, Stewart BA. Lipid compositions, baking qualities and other characteristics of wheat varieties grown in the UK. *Journal of Cereal Science.* 1987;5(3):277–86.
172. Aued-Pimentel S, Lago JHG, Chaves MH, Kumagai EE. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropenoids fatty acids from *Sterculia striata* St. Hil. Et Nauds seed oil. *Journal of Chromatography A.* 2004;1054(1-2):235–9.
173. Christie W. The LipidWeb [Internet]. Archives of Mass Spectra. 2019 [cited 2019 Sep 18]. Available from: <https://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/index.htm>

174. R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2015. ISBN 3-900051-07-0. Available from: <http://www.R-project.org/>. [Accessed 20th June 2019].
175. Ruiz J, Antequera T, Andres AI, Petron MJ, Muriel E. Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta*. 2004;520(1-2):201-5.
176. Archer A, Stolarczyk É, Doria ML, Helguero L, Domingues R, Howard JK, et al. LXR activation by GW3965 alters fat tissue distribution and adipose tissue inflammation in ob/ob female mice. *Journal of Lipid Research*. 2013;54(5):1300-11.
177. Campos AM, Ricardo F, Alves E, Reis A, Couto D, Domingues P, et al. Lipidomic investigation of eggs' yolk: Changes in lipid profile of eggs from different conditions. *Food Research International*. 2016;89:177-85.
178. Suzuki E, Sano A, Kuriki T, Miki T. Separation and determination of phospholipids in plasma employing thin-layer chromatographic plate with concentration zone or solid phase extraction. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1993;16(1):77-80.
179. Christie, W. W., Gill, S., Nordbäck, J., Itabashi, Y., Sanda, S., & Slabas, A. R. (1998). New procedures for rapid screening of leaf lipid components from Arabidopsis. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 9(2), 53-57.
180. Kim H-Y, Salem N. Separation of lipid classes by solid phase extraction. *Journal of Lipid Research*. 1990;31(12):2285-9.
181. Murphy RC. *Tandem mass spectrometry of lipids: molecular analysis of complex lipids*. Royal Society of Chemistry; 2014. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=BmwoDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=Murphy+RC.+Tandem+mass+spectrometry+of+lipids:+molecular+analysis+of+complex+lipids.+Royal+Society+of+Chemistry%3B+2014.+&ots=yr2R86OzwB&sig=3_b1Nz6Q5SVgq1BS1hOegX2MgX8#v=onepage&q=Murphy%20RC.%20Tandem%20mass%20spectrometry%20of%20lipids%3A%20molecular%20analysis%20of%20complex%20lipids.%20Royal%20Society%20of%20Chemistry%3B%202014.&f=false. [Accessed 20th June 2019].

182. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):395.
183. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003;9(8):ix – xv.
184. Aparicio R, García-González DL. Handbook of olive oil. In: Aparicio R, Harwood J. (eds.) *Olive oil characterization and traceability*. Springer; 2013. p. 431–78.
185. Uylaşer V, Yildiz G. The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014;54(8):1092–101.
186. Lionel Faure and Kent D. Chapman. *N*-acylphosphatidylethanolamines (NAPEs), *N*-acylethanolamines (NAEs) and other acylamides: Metabolism, occurrence and functions in plants [Internet]. AOCs Lipid Library. [cited 2019 Nov 19]. Available from: [https://lipidlibrary.aocs.org/chemistry/physics/plant-lipid/n-acylphosphatidylethanolamines-\(napes\)-n-acylethanolamines-\(naes\)-and-other-acylamides-metabolism-occurrence-and-functions-in-plants](https://lipidlibrary.aocs.org/chemistry/physics/plant-lipid/n-acylphosphatidylethanolamines-(napes)-n-acylethanolamines-(naes)-and-other-acylamides-metabolism-occurrence-and-functions-in-plants)
187. Chapman KD. Emerging physiological roles for *N*-acylphosphatidylethanolamine metabolism in plants: signal transduction and membrane protection. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2000;108(1-2):221–9.
188. Chen Z, Guo L, Zhang Y, Walzem RL, Pendergast JS, Printz RL, et al. Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(8):3391–406.
189. Gillum MP, Zhang D, Zhang X-M, Erion DM, Jamison RA, Choi C, et al. *N*-acylphosphatidylethanolamine, a gut-derived circulating factor induced by fat ingestion, inhibits food intake. *Cell*. 2008;135(5):813–24.
190. May-Zhang LS, Chen Z, Dosoky NS, Yancey PG, Boyd KL, Hasty AH, et al. Administration of *N*-acyl-phosphatidylethanolamine expressing bacteria to low density lipoprotein receptor^{-/-} mice improves indices of cardiometabolic disease. *Scientific Reports*. 2019;9(1):420.

191. Chen Z, Zhang Y, Guo L, Dosoky N, de Ferra L, Peters S, et al. Leptogenic effects of NAPE require activity of NAPE-hydrolyzing phospholipase D. *Journal of Lipid Research*. 2017;58(8):1624–35.
192. Alves E, Melo T, Simões C, Faustino MAF, Tomé JPC, Neves MG, et al. Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2013;27(14):1607–18.
193. Nahaie MR, Goodfellow M, Minnikin DE, Hajek V. Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Staphylococcus*. *Microbiology*. 1984;130(9):2427–37.
194. Beining PR, Huff E, Prescott B, Theodore TS. Characterization of the lipids of mesosomal vesicles and plasma membranes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1975;121(1):137–43.
195. Shireen T, Singh M, Dhawan B, Mukhopadhyay K. Characterization of cell membrane parameters of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with varied susceptibility to alpha-melanocyte stimulating hormone. *Peptides*. 2012;37(2):334–9.
196. Sutterlin HA, Zhang S, Silhavy TJ. Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2014;196(18):3214–20.
197. Calzada E, Onguka O, Claypool SM. Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2016;321:29-88.
198. Chernomordik L V, Kozlov MM. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annual Review of Biochemistry*. 2003;72(1):175–207.
199. Murínová S, Dercová K. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *International Journal of Microbiology*. 2014;2014:873081.
200. Romantsov T, Guan Z, Wood JM. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009;1788(10):2092–100.