UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PATRICIA GOLDSCHMIDT LINS

**Atividade antioxidante *in vitro* de extrato de folhas de oliveira
(*Olea europaea* L.) e seu efeito protetor sobre danos oxidativos
em eritrócitos humanos**

Pirassununga

2015

PATRICIA GOLDSCHMIDT LINS

**Atividade antioxidante *in vitro* de extrato de folhas de oliveira
(*Olea europaea* L.) e seu efeito protetor sobre danos oxidativos
em eritrócitos humanos**

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos
para a obtenção do Título de
Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Ciências
da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Mariza
Pires de Melo

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

L759a	<p>Lins, Patricia Goldschmidt</p> <p>Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de extrato de folhas de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.) e seu efeito protetor sobre danos oxidativos em eritrócitos humanos / Patricia Goldschmidt Lins. -- Pirassununga, 2015. 122 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas. Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.</p> <p>1. Espécies reativas 2. Estresse oxidativo 3. Fenólicos 4. Hemoglobina 5. Hemólise. I. Título.</p>
-------	---

*À minha família, meus pais e meu marido Guilherme,
que são minha força e inspiração em todos os meus projetos;*

*Ao meu querido tio Rubens,
que agora está na presença de Deus,
e sei que está muito orgulhoso e feliz
com a realização de mais esta etapa em minha vida;*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Mariza Pires de Melo, pela sua constante dedicação, pela confiança em mim depositada, por todos os conhecimentos transmitidos, pela amizade, e sobretudo por ser uma referência e exemplo em minha vida.

À Pós Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste doutorado, e aos professores pelos conhecimentos transmitidos;

À empresa Folhas de Oliva, na pessoa do Cosmo Pacetta, pelo fornecimento das folhas de oliveira utilizadas nos experimentos;

À especialista em laboratório Silvana Pugine, por todo o conhecimento transmitido, pela imensa colaboração em todas as etapas do doutorado, por todas as horas de trabalho dedicadas com muita competência à realização dos experimentos, pela ajuda na elaboração desta tese, principalmente das figuras, e em especial pela amizade de todas as horas. Sem sua presença e colaboração, a caminhada teria sido muito mais difícil.

Ao técnico de laboratório Antonio Marcio Scatolini, pela grande ajuda na realização dos experimentos, pela troca constante de ideias e discussões, e por todas as contribuições fornecidas ao longo do trabalho;

À Unidade Básica de Saúde (UBAS) da Prefeitura do Campus USP “Fernando Costa”, pela colaboração no fornecimento de estrutura e pessoal para as coletas de sangue, em especial à técnica de enfermagem Fabiana Macatrozzo e ao enfermeiro Geraldo Donizetti Janez.

Ao Prof. Dr. Edson Roberto da Silva por disponibilizar o equipamento para liofilização das amostras, e ao colega de pós graduação João Francisco Lucon Junior, pela ajuda na realização desta etapa do trabalho;

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira pela disponibilização do equipamento HPLC para realização das análises de quantificação de oleuropeína, em especial à especialista em laboratório Roice Rosim pela condução das análises;

Ao especialista em laboratório Rodrigo Vinicius Lourenço pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura e pelos conhecimentos transmitidos;

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão pela disponibilização do equipamento de microscopia óptica e à especialista em laboratório Giovana Merighe pela colaboração na utilização do equipamento;

Ao Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin e à Profa. Dra. Cintia Bernardo Gonçalves pelas contribuições e sugestões fornecidas no exame de qualificação, que muito contribuíram para o andamento do doutorado;

Às amigas de laboratório Marcia Ramos da Silva, Rafaela Fernandes, Andréia Vaz, Luciane Tavares e Juliana Franco, pelo prazeroso convívio e amizade;

À Dra. Tereza Guinart pelo constante incentivo e ajuda tanto na inscrição do doutorado como durante sua realização, e em especial pela sua amizade;

Ao meu marido Guilherme Silva, pelo companheirismo, paciência e constante apoio durante mais esta etapa em nossas vidas. Cada passo dado é sempre recompensado pelo simples fato de tê-lo ao meu lado na caminhada;

Aos meus pais Mauricio e Cristina, pelo incentivo na realização de mais esta etapa, pela compreensão nos momentos de ausência, e sobretudo pelo amor transmitido;

À minha família e amigos, por fazerem parte de minha vida e ser meu apoio e força nesta caminhada;

À Deus, por sempre iluminar meus passos, por todas as bênçãos recebidas, e por permitir a realização de mais esta etapa.

RESUMO

LINS, P.G. **Atividade antioxidante *in vitro* de extrato de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) e seu efeito protetor sobre danos oxidativos em eritrócitos humanos.** 2015. 122 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antioxidante de extrato de folhas de oliveira (EFO) (*Olea europaea* L.) por diferentes metodologias analíticas *in vitro* e *in situ*, para verificação de efeito em sistemas biológicos. O extrato foi obtido a partir de folhas secas de oliveira, previamente micronizadas, em metanol/água (80/20%) na proporção 1:20 (m/v), após remoção de compostos solúveis em *n*-hexano. Após liofilização, no EFO foi avaliado o poder redutor por Folin-Ciocalteu, conteúdo de flavonoides totais, teor de oleuropeína, poder de redução do íon férrico (FRAP) e atividade antioxidante sobre DPPH[•], ABTS^{•+}, ânion superóxido (O₂^{•-}), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico (NO[•]). O extrato foi também avaliado quanto ao efeito protetor sobre danos oxidativos em eritrócitos humanos. O ácido ascórbico foi utilizado como referência. O experimento foi repetido seis vezes (n = 6) e os ensaios realizados em duplicata. O poder redutor do extrato e o conteúdo de flavonoides totais e oleuropeína foram 131,7 ± 9,4 mg equivalente de ácido gálico/g extrato seco (*ms*), 19,4 ± 1,3 mg equivalente de quercetina/g *ms* e 25,5 ± 5,2 mg oleuropeína/g *ms*, respectivamente. O ensaio de FRAP apresentou 281,8 ± 22,8 mg equivalente de trolox/g *ms*. O EFO foi efetivo na inibição dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, dependente da concentração de extrato, com valores de IC₅₀ de 13,8 ± 0,8 e 16,1 ± 1,2 µg/mL, respectivamente. Com relação à atividade antioxidante sobre espécies reativas de importância biológica, o EFO apresentou forte capacidade de inibição de O₂^{•-} (IC₅₀ = 52,6 ± 2,1 µg/mL) e NO[•] (IC₅₀ = 48,4 ± 6,8 µg/mL), quando comparado ao ácido ascórbico. Porém, a inibição de HOCl não foi tão eficiente (IC₅₀ = 714,1 ± 31,4 µg/mL). O EFO inibiu a hemólise induzida em eritrócitos de maneira dependente da concentração (IC₅₀ = 7,8 ± 1,1 µg/mL), assim como a peroxidação lipídica e a formação de meta-hemoglobina, com valores de IC₅₀ de 38,0 ± 11,7 e 186,3 ± 29,7 µg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que extrato de folhas de oliveira possui efetiva atividade antioxidante em sistemas biológicos, pelo efeito sequestrador de determinadas espécies reativas que participam dos processos bioquímicos, e pela prevenção de danos oxidativos em eritrócitos humanos. Portanto, sua ingestão pode estar relacionada com a prevenção de estresse oxidativo *in vivo*, com consequentes benefícios à saúde.

Palavras-chave: espécies reativas, estresse oxidativo, fenólicos, hemoglobina, hemólise

ABSTRACT

LINS, P.G. ***In vitro* antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect against oxidative damage in human erythrocytes.** 2015. 122 p. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of olive leaf extract (OLE) (*Olea europaea* L.) by different *in vitro* and *in situ* analytical methodologies for determination of its effect in biological systems. The extract was obtained from dried olive leaves, previously micronized, in methanol/water (80/20%) in ratio 1:20 (w/v), after removal of *n*-hexane soluble compounds. After lyophilization, OLE was analyzed for reducing power by Folin-Ciocalteu, total flavonoid content, oleuropein content, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and antioxidant activity against DPPH[•], ABTS^{•+}, superoxide anion (O₂^{•-}), hypochlorous acid (HOCl), and nitric oxide (NO[•]). The extract was also analyzed against oxidative damage in human erythrocytes. Ascorbic acid was used as reference. The experiment was repeated six times (n = 6) and the assays were performed in duplicate. The reducing power and total flavonoid and oleuropein contents of extract were 131.7 ± 9.4 mg galic acid equivalent/g dry extract (*dw*), 19.4 ± 1.3 mg quercetin equivalent/g *dw*, and 25.5 ± 5.2 mg oleuropein/g *dw*, respectively. The FRAP assay was 281.8 ± 22.8 mg trolox equivalent/g *dw*. The OLE was effective in inhibition of DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals, in a concentration dependent manner, with IC₅₀ values of 13.8 ± 0.8 and 16.1 ± 1.2 µg/mL, respectively. In relation to the antioxidant activity against reactive species of biological importance, the OLE showed high ability to inhibit O₂^{•-} (IC₅₀ = 52.6 ± 2.1 µg/mL) and NO[•] (IC₅₀ = 48.4 ± 6.8 µg/mL), when compared to ascorbic acid. However, inhibition of HOCl was not as efficient (IC₅₀ = 714.1 ± 31.4 µg/mL). The OLE inhibited induced erythrocyte hemolysis in a concentration dependent manner (IC₅₀ = 7.8 ± 1.1 µg/mL) as well as lipid peroxidation and the formation of methemoglobin, with IC₅₀ values of 38.0 ± 11.7 and 186.3 ± 29.7 µg/mL, respectively. The results suggest that olive leaf extract has effective antioxidant activity in biological systems, based on its scavenging effect of certain reactive species that participate in biochemical processes, and the prevention of oxidative damage in human erythrocytes. So, the intake of olive leaf extract may be related to the prevention of *in vivo* oxidative stress, with health benefits.

Keywords: reactive species, oxidative stress, phenolics, hemoglobin, hemolysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática dos mecanismos de ação de antioxidantes	21
Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio em sistemas biológicos	24
Figura 3 – Representação esquemática de diferentes concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), refletindo o aumento de intensidade do estresse oxidativo.....	29
Figura 4 – Representação de células de eritrócitos na corrente sanguínea.....	32
Figura 5 – Molécula de hemoglobina e grupo heme.	33
Figura 6 – Estados de oxidação do ferro no grupo heme nas formas reduzida (oxi-hemoglobina) e oxidada (meta-hemoglobina) da molécula de hemoglobina.	33
Figura 7 – Representação esquemática do modelo da membrana celular.	34
Figura 8 – Estrutura química básica dos (A) compostos fenólicos e (B) flavonoides.....	37
Figura 9 – Árvore da oliveira (<i>Olea europaea</i> L.).	38
Figura 10 – Folhas frescas de <i>Olea europaea</i> L.....	39
Figura 11 – Estrutura química dos compostos fenólicos mais abundantes em extratos de folhas de oliveira.....	41
Figura 12 – Estrutura química da oleuropeína	42
Figura 13 – Fluxograma representativo do processo de obtenção do extrato de folhas de oliveira.....	45
Figura 14 – Reação do composto fenólico ácido gálico com molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu	47
Figura 15 – Reação de complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl_3), com formação do complexo estável flavonoide- Al^{3+}	48
Figura 16 – Estrutura química do radical DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	49
Figura 17 – Reação de redução do radical DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), de coloração púrpura, ao DPPH-H (2,2-difenilpicril-hidrazina), de coloração amarela, por um fenol.....	50
Figura 18 – Representação esquemática da reação de formação do radical cátion ABTS $^{+\cdot}$ a partir da oxidação do ABTS [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] na presença de persulfato de amônio.....	51

Figura 19 – Representação esquemática da reação de redução do complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{III} -TPTZ) ao complexo ferroso (Fe^{II} -TPTZ) por um agente antioxidante.....	53
Figura 20 – Representação esquemática das reações envolvidas na metodologia de atividade antioxidante sobre radical ânion superóxido e ação de um antioxidante presente no meio	54
Figura 21 – Representação esquemática da oxidação de 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) a ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) por ácido hipocloroso (HOCl) e ação de um antioxidante	55
Figura 22 – Representação esquemática da Reação de Griess	57
Figura 23 – Reação de decomposição térmica de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH), com geração de radicais peroxil na presença de oxigênio.....	59
Figura 24 – Representação esquemática da composição do sangue após centrifugação do sangue coletado.....	60
Figura 25 – Reação envolvida na metodologia de análise de peroxidação lipídica, entre malondialdeído e ácido tiobarbitúrico (TBA), com formação de um cromógeno	63
Figura 26 – Esquema ilustrativo do procedimento de determinação de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina no ensaio total, no sobrenadante e no <i>pellet</i>	65
Figura 27 – Espectro de absorção da oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina.....	66
Figura 28 – Cromatograma obtido por HPLC do extrato de folhas de oliveira processado a 280 nm com indicação de pico correspondente à oleuropeína	69
Figura 29 – Inibição dos radicais (A) $\text{ABTS}^{+\cdot}$ e (B) $\text{DPPH}^{\cdot}$ em função da concentração de extrato de folhas de oliveira (EFO) e do padrão trolox	72
Figura 30 – Capacidade de inibição de ânion superóxido em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico	76
Figura 31 – Capacidade de inibição de ácido hipocloroso em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico	78
Figura 32 – Formação de nitrito por decomposição de nitroprussiato de sódio em função do tempo de incubação na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de extrato de folhas de oliveira.....	80
Figura 33 – Capacidade de inibição de óxido nítrico em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico.....	81
Figura 34 – Hemólise induzida por AAPH (5 mM) em eritrócitos humanos (1 % hematócrito) durante o período de incubação na presença de (A) extrato de folhas de oliveira (EFO) e (B) ácido ascórbico (AA)	84

Figura 35 – Inibição de hemólise induzida por AAPH (5 mM) em eritrócitos humanos (1 % hematócrito), em 4 horas de reação, em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico	85
Figura 36 – Avaliação por microscopia óptica de hemólise em eritrócitos humanos (1 % hematócrito) após 4 horas de incubação (A) na ausência de AAPH (Controle); (B) na presença de AAPH (10 mM); (C) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (25 µg/mL); (D) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (50 µg/mL)	86
Figura 37 – Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de hemólise em eritrócitos humanos (1 % hematócrito) após 4 horas de incubação (A) na ausência de AAPH (Controle); (B) na presença de AAPH (10 mM); (C) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (25 µg/mL); (D) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (50 µg/mL)	87
Figura 38 – Peroxidação lipídica, representada pelo conteúdo de TBARS (µM), em eritrócitos (5 % hematócrito) durante 4 horas de exposição ao AAPH (50 mM), em função da concentração de extrato de folhas de oliveira (EFO) e ácido ascórbico (AA).....	89
Figura 39 – Porcentagem de inibição de peroxidação lipídica (expressa em TBARS) induzida por AAPH (50 mM) em eritrócitos (5 % hematócrito), em 3 horas de reação, em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico.	90
Figura 40 – Formação de meta-hemoglobina (µM) induzida por AAPH (50 mM) em eritrócitos humanos (5 % hematócrito) em função do tempo de reação, na presença de extrato de folhas de oliveira (EFO) e ácido ascórbico (AA)	93
Figura 41 – Porcentagem de inibição de oxidação de hemoglobina a meta-hemoglobina induzida por AAPH (50 mM) em eritrócitos humanos (5 % hematócrito), em 4 horas de reação, em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico.....	94
Figura 42 – Concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina (A) total (sobrenadante + <i>pellet</i>); (B) somente sobrenadante e (C) somente <i>pellet</i> após 4 horas de incubação dos eritrócitos (5 % hematócrito) na ausência ou presença de AAPH (50 mM)	96
Figura 43 – Concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina, em µmol/10 ¹⁰ células, no (A) sobrenadante e (B) <i>pellet</i> após 4 horas de incubação dos eritrócitos (5 % hematócrito) na ausência ou presença de AAPH (50 mM).....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio presentes em sistemas biológicos como radicais livres e não radicalares.....	22
Tabela 2 – Conteúdo dos principais compostos fenólicos presentes em extrato de folhas de oliveira ..	40
Tabela 3 – Poder redutor (Folin-Ciocalteu) e conteúdo de flavonoides totais e oleuropeína do extrato de folhas de oliveira	68
Tabela 4 – Parâmetros de relação linear entre a atividade antioxidante sobre os radicais ABTS ^{•+} e DPPH [•] e a concentração do extrato de folhas de oliveira e do padrão trolox	73
Tabela 5 – Atividades antioxidantes do extrato de folhas de oliveira e do padrão trolox, obtidas nas análises de FRAP, ABTS ^{•+} e DPPH [•] , expressas como valores de IC ₅₀ e TEAC	73
Tabela 6 – Parâmetros de relação linear entre a atividade antioxidante sobre as espécies reativas O ₂ ^{•-} , HOCl e NO [•] e a concentração do extrato de folhas de oliveira e do padrão ácido ascórbico	76
Tabela 7 – Valores de IC ₅₀ (µg/mL) relativos à atividade antioxidante sobre espécies reativas (ânion superóxido, ácido hipocloroso e óxido nítrico) por extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico	77
Tabela 8 – Parâmetros de relação linear entre a inibição de hemólise em eritrócitos humanos em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico	85
Tabela 9 – Parâmetros de relação linear entre a inibição de peroxidação lipídica em eritrócitos humanos em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico	91
Tabela 10 – Parâmetros de relação linear entre a inibição de formação de meta-hemoglobina em eritrócitos humanos em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico	94
Tabela 11 – Formação de meta-hemoglobina e oxi-hemoglobina nas hemácias totais, hemácias lisadas (sobrenadante) e nas hemácias íntegras (<i>pellet</i>) após 4 horas de incubação dos eritrócitos (5 % hematócrito) na ausência ou presença de AAPH (50 mM)	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido
ABTS	[2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]
AGE	Equivalentes de ácido gálico
ANOVA	Análise de Variância
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CUPRAC	Capacidade de redução do íon cúprico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)
IC ₅₀	Concentração de amostra para inibição de 50% na concentração do substrato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFO	Extrato de folhas de oliveira
ER	Espécie reativa
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FRAP	Poder de redução do íon férrico
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GPx	Glutathione peroxidase
HPLC	High performance liquid chromatography
MDA	Malondialdeído
MetHb	Meta-hemoglobina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBT	Azul nitro tetrazolio cloreto
NED	N-(1-naftil)etilenodiamina
NPS	Nitroprussiato de sódio
OxiHb	Oxi-hemoglobina
PBS	Tampão salino fosfato
PMS	Fenazina metassulfato
QE	Equivalentes de quercetina

RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Equivalentes de trolox
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente em trolox
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TPTZ	2,4,6-tripiridil- <i>s</i> -triazina
Trolox	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico)
UBAS	Unidade Básica de Saúde
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
ZAB	Departamento de Ciências Básicas
ZEA	Departamento de Engenharia de Alimentos

LISTA DE SÍMBOLOS

$O_2^{\cdot -}$	Radical ânion superóxido
$HOCl$	Ácido hipocloroso
$NO^{\cdot}$	Óxido nítrico
$HO_2^{\cdot}$	Radical hidroperoxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$HO^{\cdot}$	Radical hidroxil
O_2	Oxigênio
e^-	Elétron
H_2O	Água
$ONOO^-$	Peroxinitrito
Fe	Ferro
s	Segundo
Cl^-	Íon cloreto
Fe^{3+}	Íon férrico
Fe^{2+}	Íon ferroso
Cu^{2+}	Íon cúprico
nm	nanômetros
$^{\circ}C$	graus Celsius
g	grama
mL	mililitro
v/v	volume/volume
rpm	rotações por minuto
μm	micrômetro
W	Watts
pH	Potencial hidrogeniônico
mg	miligrama
m/v	massa/volume
μg	micrograma
$AlCl_3$	Cloreto de alumínio
Al^{3+}	Íon alumínio
μL	microlitro
mm	milímetro
min	minuto
μM	micromolar

mM	milimolar
Fe ^{III} -TPTZ	Complexo férrico-tripiridiltiazina
Fe ^{II} -TPTZ	Complexo ferroso-tripiridiltiazina
HCl	Ácido clorídrico
NaOCl	Hipoclorito de sódio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
M	molar
cm	centímetro
NO ₂ ⁻	Íon nitrito
cél/mL	células por mililitro
kV	quilovolt
r ²	Coeficiente de determinação
ROO [•]	Radical peroxil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	18
2.1 HIPÓTESE	18
2.2 OBJETIVOS	18
2.2.1 Objetivo geral	18
2.2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 ANTIOXIDANTES	20
3.2 ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS	21
3.2.1 Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio	21
3.2.1.1 Radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	23
3.2.1.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	24
3.2.1.3 Radical hidroxil ($HO^{\bullet}$)	25
3.2.1.4 Ácido hipocloroso ($HOCl$)	25
3.2.1.5 Óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) / peroxinitrito ($ONOO^-$)	25
3.2.2 Antioxidantes em sistemas biológicos	26
3.2.2.1 Mecanismos antioxidantes endógenos	26
3.2.2.2 Antioxidantes da dieta	27
3.2.3 Estresse oxidativo	28
3.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	30
3.3.1 Eritrócitos como modelos experimentais de sistemas biológicos	32
3.4 ANTIOXIDANTES DE ORIGEM NATURAL	35
3.5 OLEA EUROPAEA L.	37
3.5.1 Folhas de <i>Olea europaea</i> L.	39
4 METODOLOGIA	44
4.1 MATERIAIS	44
4.2 PREPARO DO EXTRATO DE FOLHAS DE OLIVEIRA	44
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	46
4.3.1 Determinação do poder redutor por Folin-Ciocalteu	46
4.3.2 Determinação do conteúdo de flavonoides totais	47
4.3.3 Determinação do conteúdo de oleuropeína por HPLC	48
4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
4.4.1 Atividade antioxidante sobre radical DPPH$^{\bullet}$	49

4.4.2 Atividade antioxidante sobre radical ABTS ^{•+}	51
4.4.3 Determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP)	53
4.4.4 Atividade antioxidante sobre ânion superóxido (O ₂ ^{•-}).....	53
4.4.5 Atividade antioxidante sobre ácido hipocloroso (HOCl)	55
4.4.6 Atividade antioxidante sobre óxido nítrico (NO [•])	56
4.5 AVALIAÇÃO DE EFEITO PROTETOR SOBRE DANOS OXIDATIVOS INDUZIDOS POR RADICAL LIVRE EM ERITRÓCITOS HUMANOS	58
4.5.1 Obtenção de eritrócitos humanos	59
4.5.2 Preparo da suspensão de eritrócitos	59
4.5.3 Efeito sobre hemólise	60
4.5.3.1 Avaliação por microscopia.....	61
4.5.4 Efeito sobre peroxidação lipídica	62
4.5.5 Efeito sobre oxidação de hemoglobina.....	64
4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE OLEA EUROPAEA L.	68
5.2 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	71
5.2.1 Determinação da atividade antioxidante sobre ABTS ^{•+} e DPPH [•] e do potencial redutor sobre o íon férrico (FRAP)	71
5.2.2 Atividade antioxidante sobre O ₂ ^{•-} , HOCl e NO [•]	75
5.2.2.1 Atividade antioxidante sobre O ₂ ^{•-}	75
5.2.2.2 Atividade antioxidante sobre HOCl	78
5.2.2.3 Atividade antioxidante sobre NO [•]	79
5.3 AVALIAÇÃO DE EFEITO PROTETOR SOBRE DANOS OXIDATIVOS INDUZIDOS POR RADICAL LIVRE EM ERITRÓCITOS HUMANOS	83
5.3.1 Efeito sobre hemólise	83
5.3.2 Efeito sobre peroxidação lipídica	88
5.3.3 Efeito sobre oxidação de hemoglobina.....	92
6 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE	117
ANEXO	120

1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas biológicos, os antioxidantes previnem o estresse oxidativo, associado a danos celulares, que prejudicam importantes funções metabólicas, e estão relacionados ao envelhecimento e várias doenças crônicas, como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, entre outras (DRÖGE, 2002). Desta forma, o consumo de antioxidantes na dieta tem sido relacionado à redução na incidência destas doenças.

Neste contexto, produtos naturais, ricos em compostos antioxidantes como vitaminas, minerais, carotenoides e fenólicos, mais especificamente flavonoides, tem sido foco de diversos estudos nas últimas décadas. Por um lado, a crescente busca pelo consumo de alimentos naturais está associada à ação antioxidante *in vivo* e prevenção dos danos relacionados ao estresse oxidativo. Por outro lado, aditivos naturais com características antioxidantes estão substituindo os aditivos sintéticos na prevenção da oxidação em alimentos.

A oliveira (*Olea europaea* L.) possui grande importância histórica e comercial, sendo seu principal produto, o azeite de oliva, característico da dieta mediterrânea, bastante conhecido por seus efeitos antioxidantes e outros benefícios à saúde (GHANBARI et al., 2012). As folhas de oliveira, resíduo gerado no processamento da oliveira, possuem composição rica em compostos com propriedades antioxidantes, e têm sido bastante estudadas nos últimos anos. Inúmeros estudos demonstraram que extratos destas folhas possuem alto teor de compostos fenólicos, com efetiva atividade antioxidante *in vitro* e quando aplicados em alimentos (RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015). Porém, o estudo dos efeitos destes extratos em sistemas biológicos é necessário para que se possa verificar se também há ação antioxidante *in vivo* e sugerir que sua ingestão pode trazer benefícios à saúde.

Neste sentido, o presente estudo propõe a identificação de possíveis efeitos antioxidantes de extrato de folhas de *Olea europaea* L. em sistemas biológicos, especificamente relacionados a processos bioquímicos celulares. Desta forma, a atividade antioxidante do extrato de folhas de oliveira foi avaliada por análises químicas *in vitro*, incluindo espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que participam dos processos bioquímicos. Além disto, eritrócitos humanos foram utilizados como modelos celulares experimentais para avaliação de efeito protetor do extrato contra danos oxidativos induzidos, simulando situação de estresse oxidativo em sistemas biológicos.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que extrato de folhas de *Olea europaea* L., conhecidas por suas características antioxidantes *in vitro*, possuem também atividade antioxidante em sistemas biológicos, frente a espécies reativas que participam dos processos bioquímicos celulares e frente a danos oxidativos em eritrócitos humanos. A confirmação desta hipótese sugere que a ingestão de extrato de folhas de oliveira pode estar relacionada com a prevenção de estresse oxidativo *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e *in situ* de extratos de folhas de *Olea europaea* L., em comparação com antioxidante comercial natural (ácido ascórbico), para identificação de possível efeito antioxidante nos processos bioquímicos celulares.

2.2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) Caracterizar extratos de folhas de *Olea europaea* L. quanto ao seu poder redutor sobre o reagente Folin-Ciocalteu e conteúdo de flavonoides totais e oleuropeína;
- b) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de folhas de *Olea europaea* L. quanto aos parâmetros:
 - atividade antioxidante sobre radicais livres sintéticos: DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS^{•+} [2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)];
 - poder de redução do íon férrico (FRAP);
 - atividade antioxidante sobre espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio que participam de processos oxidativos celulares: ânion superóxido (O₂^{•-}), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico (NO[•]).

- c) Avaliar o efeito protetor de extratos de folhas de *Olea europaea* L. sobre dano oxidativo induzido por radical livre em eritrócitos humanos com relação a:
- hemólise;
 - peroxidação lipídica;
 - oxidação de hemoglobina.
- d) Avaliar visualmente o efeito protetor de extratos de folhas de *Olea europaea* L. sobre a quantidade e morfologia de eritrócitos humanos após dano oxidativo induzido por radical livre, por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura;
- e) Comparar os extratos de folhas de *Olea europaea* L. com o antioxidante comercial ácido ascórbico (AA) quanto às suas atividades antioxidantes avaliadas por diferentes metodologias.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIOXIDANTES

Halliwell e Gutteridge (1999, p.106) propõem uma definição geral de antioxidante como “[...] qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas às do substrato oxidável, atrasa ou previne significativamente a oxidação deste substrato”. O termo “substrato oxidável” inclui todo tipo de molécula passível de sofrer reação de oxidação, ou seja, perda de elétrons (HALLIWELL et al., 1995). Desta forma, devido a grande quantidade e variedade de moléculas passíveis de oxidação nos sistemas biológicos e químicos, em geral, os antioxidantes possuem importante relevância em diversas áreas do conhecimento, como Química, Bioquímica, Medicina, Nutrição, Farmácia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, entre outras.

Os primeiros estudos relacionados aos antioxidantes foram desenvolvidos durante a década de 1920 por Moureu e Dufraisse (1926), diante da necessidade em prevenir alterações de uma substância extremamente instável, a acroleína, utilizada como arma química na Primeira Guerra Mundial. A partir desta época, os antioxidantes passaram a ser objeto de estudos em várias áreas, principalmente de radiação, polímeros, e tecnologia de combustão (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). Na década de 1940 antioxidantes já eram usados na área cosmética e de alimentos (SHAHIDI, 2000). Em sistemas biológicos, na década de 1960, a importância dos antioxidantes aumentou consideravelmente com a descoberta da superóxido dismutase (SOD), enzima antioxidante responsável pela conversão do radical ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). Posteriormente, até os dias atuais, inúmeros estudos foram realizados para melhor entendimento dos sistemas antioxidantes e mecanismos de ação envolvidos.

Os antioxidantes podem atuar em sistemas biológicos e químicos por diferentes mecanismos (Figura 1): (a) impedindo a formação de radicais livres e outras espécies reativas; (b) interrompendo a propagação das reações de oxidação em cadeia; (c) atuando como sequestradores de radicais livres e outras espécies reativas; (d) atuando em sinergismo com outros antioxidantes; (e) atuando como agentes redutores que convertem espécies reativas a compostos estáveis; (f) atuando como quelantes de metais (principalmente ferro e cobre) e convertendo-os em compostos estáveis e; (g) inibindo enzimas pró-oxidantes (CAROCHO; FERREIRA, 2013; KOLTOVER, 2010).

Figura 1 – Representação esquemática dos mecanismos de ação de antioxidantes

ER: espécies reativas
Fonte: Própria autoria

O desempenho de um antioxidante nos sistemas biológicos e químicos depende de alguns fatores, como o tipo de agente oxidante, e qual é a molécula oxidável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Desta forma, um antioxidante pode prevenir a oxidação em determinado sistema ou determinada molécula, mas não ser eficiente, ou até mesmo causar danos, em outra situação. Como exemplo, uma substância antioxidante que atua na oxidação de lipídios pode não proteger outras moléculas, como proteínas; ou atuar sobre uma determinada espécie reativa e não ser efetiva sobre outras (HALLIWELL et al. 1995).

Nos sistemas biológicos, os antioxidantes auxiliam na proteção das células e moléculas contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). E nos alimentos, os antioxidantes são usados, principalmente, como aditivos para prevenir oxidação lipídica, mantendo a qualidade e prolongando o prazo comercial dos produtos.

3.2 ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

3.2.1 Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio

Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio são átomos e moléculas instáveis, que incluem radicais livres e outras espécies não radicalares (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Exemplos de ERO e ERN presentes em sistemas biológicos estão apresentados na Tabela 1. A reatividade destas espécies é relativa, ou seja, varia em função do tipo de espécie reativa (ER) e das moléculas e átomos alvos (HALLIWELL; GUTTERIDGE,

1999). Os radicais livres, por exemplo, possuem, em geral, alta reatividade, devido principalmente à presença de um ou mais elétrons não pareados em seu orbital externo, e são, ao mesmo tempo, capazes de existência independente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PISOSCHI; POP, 2015). As reações químicas envolvendo ERO/ERN são diversas e tratam-se, principalmente, de reações de oxidorredução, que geralmente ocorrem em cadeia (RAHMAN, 2007).

Tabela 1 – Exemplos de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio presentes em sistemas biológicos como radicais livres e não radicalares

	Radicais livres	Não radicalares
ERO	Radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
	Radical hidroxil ($OH^{\cdot}$)	Oxigênio singlete (1O_2)
	Radical peroxil ($RO_2^{\cdot}$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
	Radical hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$)	Ozônio (O_3)
ERN	Óxido nítrico ($NO^{\cdot}$)	Ácido nitroso (HNO_2)
	Dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot}$)	Peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$)
		Ácido peroxinitroso ($ONOOH$)

ERO: Espécies reativas de oxigênio; ERN: Espécies reativas de nitrogênio

Fonte: adaptado de:

PREISER, J-C. Oxidative stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.36, p.147-154, 2012.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.

Nos sistemas biológicos, há uma produção contínua de ERO e ERN, como parte normal do metabolismo celular aeróbico, essencial em determinadas atividades celulares, como produção de energia pela mitocôndria, processos bioquímicos celulares, apoptose, transporte iônico, dentre outras (LÜ et al., 2010; PREISER, 2012). As ER em quantidades moderadas representam moléculas de sinalização que estão envolvidas na regulação da proliferação celular, apoptose e expressão gênica, e fazem parte do equilíbrio redox celular (PISOSCHI; POP, 2015).

A produção *in vivo* de ER ocorre por diferentes caminhos em diversos tipos de células, sendo que a contínua produção de pequenas quantidades de ER ocorre principalmente nas células mitocondriais, na cadeia respiratória aeróbia para geração de energia, e via ação catalítica de enzimas, durante processos de transferência de elétrons (BIANCHI; ANTUNES, 1999; MITTLER, 2002; RAHMAN, 2007). Além disto, em processos inflamatórios agudos, os fagócitos produzem altas quantidades de ER, como parte do sistema imunológico para combater partículas e microrganismos estranhos, e por isto, as ER são essenciais nos mecanismos de defesa do organismo (PISOSCHI; POP, 2015; PREISER, 2012; VALENTÃO

et al., 2003). Alguns fatores externos também podem aumentar a produção de radicais livres nos sistemas biológicos, como o tabagismo, drogas, álcool, medicamentos, pesticidas, poluição ambiental, radiações gama e ultravioleta, ozônio, entre outros (BIANCHI; ANTUNES, 1999; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Nos processos aeróbios para produção de energia e calor, o oxigênio molecular é reduzido progressivamente em várias reações que envolvem enzimas e metais, gerando diversas espécies reativas intermediárias, como radical hidroperoxil ($\text{HO}_2^\bullet$), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$), de acordo com eq. (1) a (5) (PISOSCHI; POP, 2015). Além disto, a partir destas espécies reativas, outras são geradas no metabolismo biológico, em reações subsequentes, como ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$). Uma representação esquemática da produção de ERO/ERN está apresentada na Figura 2.

3.2.1.1 Radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

A produção de radical ânion superóxido ocorre principalmente dentro da mitocôndria celular, durante a cadeia de transporte de elétrons, e por sistemas enzimáticos, por enzimas oxidases e peroxidases (Figura 2) (ARUOMA, 1994; DRÖGE, 2002). Além disto, ocorre formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em reações de oxidação não catalíticas, como a auto-oxidação de grupos heme, que ocorre naturalmente nas células em pequenas quantidades, convertendo oxi-hemoglobina em meta-hemoglobina (KNIGHT, 1998; WINTERBOURN, 1990).

O radical ânion superóxido participa de alguns processos químicos importantes nos sistemas biológicos, e tem importância vital para as células de defesa do organismo, pois é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos durante processos inflamatórios, para combater vírus, bactérias ou fungos. Apesar de ser um bactericida fraco, a partir dele são geradas outras espécies reativas com forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito (ONOO^-) (Figura 2) (BARREIROS; DAVID;

DAVID, 2006). Além disto, participa de reações que geram radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$), uma espécie de alta reatividade a biomoléculas.

Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio em sistemas biológicos

Oxigênio (O_2) é convertido a ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pela cadeia respiratória mitocondrial ou por enzimas. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado pela dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ espontânea ou pela enzima superóxido dismutase (SOD). H_2O_2 pode ser convertido a H_2O pela enzima catalase ou glutatona peroxidase (GPx), ou convertido não enzimaticamente a radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$) na presença de ferro (Fe) ou a ácido hipocloroso (HOCl) por peroxidases. Óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é formado pela enzima óxido nítrico sintase pela combinação de oxigênio e arginina e se combina a $\text{O}_2^{\bullet-}$ espontaneamente formando peroxinitrito (ONOO^-).

Fonte: adaptado de PREISER, J-C. Oxidative stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.36, p.147–154, 2012.

3.2.1.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa não radicalar, é principalmente gerado *in vivo* a partir da dismutação de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando H_2O_2 e oxigênio (O_2) (Figura 2), conforme eq. (6).

O H_2O_2 gerado nos sistemas biológicos é parcialmente eliminado pelas enzimas catalase, glutatona peroxidase (GPx) e outras peroxidases (Figura 2), porém, a maior quantidade de H_2O_2 é liberado para as células (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O

H_2O_2 tem bastante habilidade em penetrar membranas biológicas, podendo causar degradação de proteínas heme, com liberação de ferro, inativação de enzimas, e oxidação de ácido desoxiribonucleico (DNA) e lipídios (KOHEN; NYSKA, 2002). Além disto, o H_2O_2 se converte a outras espécies mais reativas, como radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$) e ácido hipocloroso (HOCl) (Figura 2).

3.2.1.3 Radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$)

O radical hidroxil é formado nos sistemas biológicos principalmente a partir de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na presença de metais de transição, como o ferro (Figura 2), e pela radiólise da água por exposição à radiação ionizante (eq.7) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Trata-se da ERO de maior reatividade nos sistemas biológicos, com meia vida muito curta (10^{-9} s), que pode reagir no próprio local de formação com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas, como proteínas, DNA, ácidos graxos, aminoácidos, açúcares e metais, causando danos celulares (ARUOMA, 1994; GUTTERIDGE, 1994).

3.2.1.4 Ácido hipocloroso (HOCl)

O ácido hipocloroso (HOCl) é formado nos macrófagos e neutrófilos em sistemas biológicos, na presença da enzima mieloperoxidase, a partir de H_2O_2 e íons cloreto (Cl^-) (Figura 2) (PISOSCHI; POP, 2015; PREISER, 2012).

O HOCl é um potente oxidante, que desempenha papel importante na função bactericida *in vivo*. No entanto, seu excesso pode causar danos em moléculas biológicas, podendo causar lesões teciduais (LÜ et al., 2010; PREISER, 2012).

3.2.1.5 Óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) / peroxinitrito (ONOO^-)

O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) pode ser produzido nos sistemas biológicos pela ação de enzimas óxido nítrico sintases, a partir do aminoácido arginina (KOHEN; NYSKA, 2002), ou pela ação de fagócitos em processos inflamatórios (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O óxido nítrico tem importantes funções em vários processos fisiológicos, como

vasodilatação, regulação de pressão sanguínea, neurotransmissão, regulação imunológica e relaxamento muscular (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; HALLIWELL, 1996; VALKO et al., 2007).

Porém, a toxicidade do $\text{NO}^\bullet$ está principalmente relacionada à sua capacidade de reagir com radical ânion superóxido, e formar um intermediário reativo peroxinitrito (ONOO^-) (Figura 2), que é um potente oxidante, capaz de causar danos a diversas biomoléculas, como DNA e lipídios, além de se decompor liberando radicais hidroxil (GUTTERIDGE, 1994; PREISER, 2012; VALKO et al., 2007).

3.2.2 Antioxidantes em sistemas biológicos

Para manter um equilíbrio nos níveis intracelulares das ERO e ERN *in vivo*, os sistemas biológicos, incluindo o metabolismo humano, possuem mecanismos complexos de defesa antioxidante, que envolvem dois principais grupos: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Estes dois grupos antioxidantes trabalham sinergicamente, e sua combinação protege células e órgãos contra danos causados por excesso de ERO/ERN (RAHMAN, 2007; VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003). Os antioxidantes nos sistemas biológicos podem atuar diretamente sobre as ERO/ERN, sequestrando-as ou inativando-as, ou, ainda, reparar os danos causados no organismo por estas espécies (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A defesa antioxidante nos sistemas biológicos consiste de mecanismos antioxidantes endógenos, ou seja, sintetizados *in vivo*, pelo próprio organismo, e antioxidantes da dieta, também conhecidos como exógenos.

3.2.2.1 Mecanismos antioxidantes endógenos

Os mecanismos de defesa antioxidante endógenos dos sistemas biológicos são compostos por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Importantes enzimas antioxidantes, produzidas nos sistemas biológicos, fazem parte dos mecanismos enzimáticos, que previnem a formação ou neutralizam radicais livres, sendo principalmente: glutathione peroxidase, que doa elétrons para redução de peróxidos; catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular; e superóxido dismutase, que converte ânions superóxido em peróxido de hidrogênio como substrato para a catalase (LÜ et al. 2010;

RAHMAN, 2007; VALKO et al., 2007). Já a defesa antioxidante não enzimática inclui uma variedade de compostos produzidos no próprio metabolismo biológico, como cofatores enzimáticos, compostos nitrogenados (ácido úrico), peptídeos (glutathiona) e vitamina A (retinol) (CAROCHO; FERREIRA, 2013; SCHMITT et al., 2014; VALKO et al., 2007),

Apesar de sua notável eficiência, os mecanismos de defesa antioxidante endógenos não são suficientes e, portanto, em adição a estes, os organismos vivos dependem também de antioxidantes exógenos, que são adquiridos através da dieta (BIANCHI; ANTUNES, 1999; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

3.2.2.2 Antioxidantes da dieta

Além dos antioxidantes produzidos *in vivo*, a defesa antioxidante do organismo também utiliza antioxidantes exógenos, que são obtidos através da dieta. De acordo com definição proposta por *Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary References Intakes* (1998), antioxidantes da dieta são substâncias presentes nos alimentos que reduzem significativamente os efeitos adversos de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, ou ambos, nas funções fisiológicas normais em humanos. A ingestão destes antioxidantes na dieta auxilia os mecanismos endógenos de defesa antioxidante *in vivo* (HARASYM; OLEDZKI, 2014; TULIPANI et al. 2011).

Os antioxidantes exógenos incluem vitaminas, minerais, carotenoides e compostos fenólicos, onde se destacam os flavonoides, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Dentre estes compostos adquiridos na dieta, alguns são essenciais para o metabolismo celular biológico, principalmente o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), selênio, zinco, entre outros (CAROCHO; FERREIRA, 2013; SCHMITT et al., 2014). O ácido ascórbico, normalmente encontrado no organismo na forma de ascorbato, desempenha papéis metabólicos fundamentais, atuando como cofator de várias enzimas, agente redutor de metais de transição (em particular Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos de enzimas ou nas formas livres no organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; KOHEN; NYSKA, 2002). O ácido ascórbico pode ser sintetizado por plantas e alguns animais, porém, os humanos não possuem a enzima necessária para sua síntese e, portanto, dependem exclusivamente da dieta para sua obtenção (KOHEN; NYSKA, 2002). O α -tocoferol é um antioxidante lipofílico, que atua principalmente nas membranas celulares, inibindo a peroxidação lipídica, pela

interrupção das reações radicalares em cadeia (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os carotenoides, principalmente o β -caroteno, agem na redução da oxidação de DNA e lipídios, como desativadores do oxigênio singlete ou como sequestradores de radicais peroxil (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os compostos antioxidantes exógenos são encontrados principalmente em produtos naturais, como frutas, verduras, legumes e plantas em geral (BIANCHI; ANTUNES, 1999; JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004), e por isto há uma crescente busca por estes alimentos, chamados de alimentos funcionais. Dentre os antioxidantes presentes nos vegetais, como frutas e plantas, os mais frequentes e ativos são os compostos fenólicos.

A ingestão de antioxidantes na dieta, através de sua presença natural ou intencional nos alimentos, é foco de diversos estudos em animais e humanos, principalmente com o objetivo de verificar se estes atuam também como antioxidantes *in vivo* (HARASYM; OLEDZKI, 2014; TULIPANI et al. 2011). Além disto, estudos de suplementação em humanos relacionam a ingestão de alimentos antioxidantes, como os compostos fenólicos, com a prevenção ou adiamento de doenças crônicas e cardiovasculares, câncer, entre outras, associadas ao estresse oxidativo (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; DAI; MUMPER, 2010; HUNG et al., 2004; STEER et al., 2002).

3.2.3 *Estresse oxidativo*

Apesar das funções fisiológicas essenciais das ER, suas concentrações intracelulares são controladas nos sistemas biológicos por mecanismos antioxidantes, que neutralizam o excesso de formação de ER nos organismos (PREISER, 2012; VALKO et al., 2007; SCHMITT et al., 2014). O equilíbrio entre a produção e a neutralização de ERO/ERN por antioxidantes em sistemas biológicos, conhecido como processo de “regulação redox”, é bastante delicado, e se há um desequilíbrio com altos níveis de espécies reativas (pró-oxidantes) e baixa atividade dos mecanismos antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (CAROCHO; FERREIRA, 2013; PREISER, 2012). O estresse oxidativo pode ser definido como um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que não pode ser neutralizado pela ação de antioxidantes, e também como uma perturbação do equilíbrio redox das células (PISOSCHI; POP, 2015).

Na Figura 3 estão representadas esquematicamente diferentes concentrações intracelulares de ER, refletindo situações de estresse oxidativo. A área 1 representa uma situação de equilíbrio entre a concentração de ER e os mecanismos antioxidantes. Nas áreas 2-4 há um aumento transitório destas concentrações, em resposta a algum estímulo fisiológico, mas que é rapidamente controlado pelos mecanismos antioxidantes. Quando este aumento é pronunciado e não é contrabalanceado (áreas 5-6), significa que há um desequilíbrio e os mecanismos antioxidantes não foram suficientes para neutralizar o excesso de formação de ER, indicando situações de estresse oxidativo.

Figura 3 – Representação esquemática de diferentes concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), refletindo o aumento de intensidade do estresse oxidativo

Área 1: nível de estado estacionário; área 2: desequilíbrio funcional observado após estimulação fisiológica; área 3: estresse oxidativo crônico; área 4: desregulação aguda após forte estimulação (exemplo inflamação aguda); área 5 e 6: estresse oxidativo transitório e sustentado associado a disfunções e danos celulares.

Fonte: adaptado de PREISER, J-C. Oxidative stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.36, p.147–154, 2012.

Esta condição de desequilíbrio, ou seja, o excesso de ERO/ERN, pode causar danos em estruturas celulares, incluindo lipídios e membranas, proteínas, DNA e RNA (ácido ribonucleico), prejudicando suas funções normais, podendo levar à morte celular (CAROCHO; FERREIRA, 2013; VALKO et al., 2007). Alterações no DNA e RNA causam sérios danos às células, como a ocorrência de mutações; alterações nos aminoácidos de uma enzima podem causar a perda de sua atividade, ou ainda, alteração nesta atividade; oxidação de lipídios e proteínas das membranas celulares interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona sua ruptura (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Inúmeros estudos relacionam as lesões celulares, causadas pelo estresse oxidativo, a várias doenças crônicas, como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, entre outras (DRÖGE, 2002; LIU; HOTCHKISS, 1995; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014; STEER et al., 2002; VALKO et al., 2007), assim como ao processo de envelhecimento (BECKMAN; AMES, 1998; FINKEL; HOLBROOK, 2000; RAHMAN, 2007). Da mesma forma, o consumo de antioxidantes na dieta, na forma de produtos vegetais, como frutas, plantas e ervas, tem sido relacionado à redução na incidência destas doenças (DAI; MUMPER, 2010; HUNG et al., 2004; PREISER, 2012; ROLEIRA et al., 2015).

3.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante de um composto pode ser avaliada por diversos métodos químicos de análise (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; LÜ et al., 2010). Uma vez que radicais livres e outras espécies reativas são iniciadores dos processos oxidativos, os ensaios *in vitro* de determinação de atividade antioxidante normalmente avaliam a capacidade sequestradora de um composto frente a um determinado radical livre ou outra espécie reativa. Os diversos tipos de metodologias são baseados em diferentes mecanismos de ação, que fornecem diferentes informações a respeito da ação antioxidante de uma amostra (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Desta forma, para avaliar o efeito antioxidante potencial de um composto nos sistemas biológicos, considerando a complexidade envolvida nos mecanismos de ação *in vivo*, onde não há apenas um único intermediário reativo envolvido, normalmente podem ser utilizados diferentes métodos para determinação do perfil antioxidante.

Os radicais livres DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS^{•+} [2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] são os mais comumente utilizados para avaliar a atividade antioxidante (FLOEGEL et al., 2011; HUANG; OU; PRIOR, 2005). Estas análises são baseadas na avaliação do consumo destes radicais livres estáveis pelo antioxidante. O radical DPPH[•] absorve luz tipicamente em comprimento de onda por volta de 515 nm, enquanto que o ABTS^{•+} absorve em comprimento de onda por volta de 750 nm. Na presença de um antioxidante, ocorre um decréscimo na intensidade das absorbâncias (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). No entanto, estas metodologias utilizam compostos sintéticos que não estão presentes nos processos oxidativos celulares em sistemas biológicos.

Outros tipos de métodos utilizados são baseados na capacidade dos antioxidantes em reduzir íons de metal, como férrico e cúprico, como no caso das análises de FRAP (poder de redução do íon férrico) e CUPRAC (capacidade de redução do íon cúprico), respectivamente.

Em adição a estas análises químicas, a utilização de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que fazem parte dos sistemas biológicos, para avaliação de atividade antioxidante de um composto, sugere de maneira mais precisa seus efeitos nos sistemas biológicos. Cada método avalia a atividade contra uma determinada espécie reativa de oxigênio ou nitrogênio, e por isto, a combinação destas técnicas reflete melhor a atividade antioxidante de uma amostra. Neste contexto, espécies reativas que são produzidas *in vivo*, como por exemplo, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, radical hidroxil e óxido nítrico, são utilizadas para simulação *in vitro* dos processos oxidativos e determinação de atividade antioxidante e podem sugerir os efeitos antioxidantes *in vivo* de um composto (HALLIWELL et al., 1995; KONYALIOGLU; KARAMENDERES, 2005; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Estas análises baseiam-se no sequestro destas espécies reativas pelo antioxidante em estudo, de forma a evitar que estas espécies reativas reajam com algum composto alvo, que normalmente pode ser avaliado espectrofotometricamente.

Além disto, para melhor esclarecer as propriedades antioxidantes de um composto, assim como os efeitos do mesmo no metabolismo celular, inclusive humano, devem ser realizados estudos diretamente em células animais ou humanas, assim como vem sendo feito em inúmeros trabalhos (SHEN; JI; ZHANG, 2007; TRIPATHI; MOHAN; KAMAT, 2007). De acordo com López-Alarcón e Denicola (2013) estudos *in vivo*, com modelos animais e humanos, seriam os mais apropriados para avaliar a capacidade antioxidante, porém são de alto custo e demorados, o que torna os ensaios celulares *in vitro* muito atrativos e eficientes como metodologias intermediárias, em combinação com ensaios químicos tradicionalmente utilizados. Neste contexto, eritrócitos têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais de sistemas biológicos (ARBOS et al., 2008; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; PAIVA-MARTINS et al., 2009a; PANDEY; RIZVI, 2011; REDDY et al., 2007; ZHANG et al., 2014).

3.3.1 Eritrócitos como modelos experimentais de sistemas biológicos

Eritrócitos, obtidos de sangue animal ou humano, são utilizados como bons modelos celulares experimentais para estudos de efeitos biológicos com radicais livres, uma vez que possuem estrutura simples e são facilmente obtidos (GIÃO et al., 2010; PANDEY; RIZVI, 2011). Também conhecidos como hemácias, os eritrócitos são as células vermelhas do sangue, com característico formato bicôncavo (Figura 4), cuja função principal é transportar oxigênio para os tecidos, através da proteína de transporte de oxigênio, a hemoglobina (ARBOS et al., 2008).

Figura 4 – Representação de células de eritrócitos na corrente sanguínea

Fonte: HEMATOCRITO. Disponível em: <<http://hematocrito.org/>>. Acesso em: 08 nov. 215.

A hemoglobina é a principal proteína presente nos eritrócitos, densamente situada no citoplasma, constituindo cerca de 90 % do peso seco da célula (PANDEY; RIZVI, 2011). Trata-se de uma proteína globular, de estrutura quaternária, com quatro cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias de globina, sendo que cada uma delas encontra-se ligada a um grupo heme, que é constituído por um átomo central de ferro ligado a protoporfirina IX (Figura 5) (GONÇALVES, 2015). Na forma oxi-hemoglobina o estado de ferroso (Fe^{2+}) do átomo central permite uma ligação coordenada com o oxigênio molecular, além das 4 ligações coordenadas planares com a protoporfirina e uma ligação distal com o nitrogênio do resíduo histidina da cadeia polipeptídica (Figura 5). A função da hemoglobina de transporte de oxigênio ocorre pela ligação do oxigênio com os átomos de ferro (II) presentes nos grupos heme. Apesar de o eritrócito possuir um sistema antioxidante eficiente, o íon ferroso, presente na molécula de hemoglobina (oxi-hemoglobina), é continuamente exposto a altas concentrações de agentes oxidantes, levando a sua oxidação à meta-hemoglobina (Fe^{3+})

(Figura 6) que, diferente da forma reduzida, não tem capacidade de transportar oxigênio (ARBOS et al., 2008).

Figura 5 – Molécula de hemoglobina e grupo heme

Fonte: Própria autoria

Fontes imagens:

BUZZLE.COM. **Structure of hemoglobin**. Disponível em: < <http://www.buzzle.com/articles/structure-of-hemoglobin.html>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

CUMMINGS, B. Disponível em: <<http://www.quia.com/jg/1366108list.html>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

ORDWAY, G.A.; GARRY, D.J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p.3441–3446, 2004.

Figura 6 – Estados de oxidação do ferro no grupo heme nas formas reduzida (oxi-hemoglobina) e oxidada (meta-hemoglobina) da molécula de hemoglobina

Fonte: adaptado de IRWIN. **Methemoglobinemia**. Disponível em:

<<http://illustratedmedicine.blogspot.sg/2010/09/methemoglobinemia.html>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

Os eritrócitos são bastante susceptíveis ao estresse oxidativo, uma vez que suas membranas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, além de possuírem altas concentrações de hemoglobina e oxigênio, que podem agir como promotores do processo oxidativo (PANDEY; RIZVI, 2011; SIMÃO et al., 2006). Em condições adversas, os eritrócitos estão entre as primeiras células do organismo a ser afetadas. Desta forma, são utilizados como modelos para estudos celulares dos mecanismos de oxidação gerados por radicais livres (SATO et al., 1995) e para verificar o potencial antioxidante de determinados compostos (FERREIRA et al., 2007; KONYALIOGLU; KARAMENDERES, 2005; MANNA et al., 1999; TULIPANI et al., 2011).

Os eritrócitos não possuem núcleo e mitocôndria, então, a resposta celular antioxidante deste tipo de célula considera, principalmente, a permeabilidade dos compostos na membrana, bem como a interação com os sistemas antioxidantes no citoplasma (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). A preservação da estrutura e função da membrana dos eritrócitos é essencial na manutenção da adequada permeabilidade e flexibilidade assim como o balanço iônico entre os o meio intracelular e extracelular (PANDEY; RIZVI, 2011). A membrana celular eritrocitária é composta principalmente de fosfolipídios, formando uma bicamada lipídica, e proteínas (Figura 7), principais alvos de danos causados por excesso de ERO/ERN, em situações de estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PANDEY; RIZVI, 2011).

Figura 7 – Representação esquemática do modelo da membrana celular

Fonte: MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.2, p.168–178, 2007.

As principais alterações nos eritrócitos em situações de estresse oxidativo são peroxidação lipídica, oxidação das proteínas da membrana, oxidação de hemoglobina e hemólise, ou seja, quebra das hemácias, por rompimento da membrana plasmática (ARBOS et al., 2008; PAIVA-MARTINS et al., 2009a). A bicamada lipídica da membrana eritrocitária é rica em ácidos graxos poli-insaturados e, portanto, altamente susceptível à peroxidação lipídica. Uma vez que os lipídios são essenciais para manter a forma das células vermelhas do sangue, a oxidação dos ácidos graxos causa mudanças na superfície da membrana, que podem levar a alterações morfológicas e estruturais (PANDEY; RIZVI, 2011). Com relação à oxidação da hemoglobina, a exposição das células a agentes oxidantes, como radicais livres, provoca um aumento na oxidação de oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina, prejudicando as funções celulares dos eritrócitos (ARBOS et al., 2008).

Em estudos biológicos laboratoriais, são utilizados compostos geradores de radicais livres, como o AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido) ou peróxido de hidrogênio, como indutores de estresse oxidativo em eritrócitos. O AAPH é um composto azo hidrossolúvel, que gera radicais hidroperoxil ($\text{HO}_2^{\bullet}$) em sua degradação térmica em meio aquoso a 37 °C, a uma taxa constante, induzindo a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e hemólise em eritrócitos (PAIVA-MARTINS et al., 2009a).

3.4 ANTIOXIDANTES DE ORIGEM NATURAL

A identificação de compostos naturais com ação antioxidante é foco de vários estudos nos últimos anos (JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013; KATALINIC et al., 2006; KIM; CHO; HAN, 2013; NASSU et al., 2003), devido ao grande interesse na prevenção de estresse oxidativo associado à doenças crônicas, e na prevenção de oxidação em alimentos, como alternativas naturais para substituição dos antioxidantes sintéticos (AARDT et al., 2005; AHN; NAM, 2004; KARRE; LOPEZ; GETTY, 2013; KIM; DECKER; LEE, 2012). Os antioxidantes sintéticos são bastante utilizados em produtos alimentícios, principalmente para prevenir reações de oxidação lipídica ou proteica, que afetam algumas características de qualidade dos alimentos (CAROCHO; FERREIRA, 2013; KUBOW, 1992; LUND et al., 2011; TRINDADE; MANCINI-FILHO; VILLAVICENCIO, 2010). Apesar de estudos comprovarem que a utilização destes compostos sintéticos nos níveis permitidos é segura, há estudos que alegam que a ingestão de altas doses, maiores que as permitidas, tem efeitos tóxicos em humanos e animais (FAINE et al., 2006; FRITSCHKE; MCGUIRE, 1997;

KOLTOVER, 2010; WILLIAMS; IATROPOULOS; WHYSNER, 1999). Desta forma, há uma controvérsia com relação à utilização destes aditivos sintéticos, e por isto, há uma busca crescente pela substituição por compostos antioxidantes naturais.

De maneira geral, os compostos naturais com ação antioxidante são vitaminas, minerais, carotenoides e compostos fenólicos, importantes constituintes de frutas, plantas, grãos e demais vegetais (BIANCHI; ANTUNES, 1999; JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013). Estes compostos antioxidantes são inúmeros, sendo que entre eles encontram-se as vitaminas C e E; carotenoides como β -caroteno, licopeno e luteína; e fenólicos como quercetina, hidroxitirosol, ácido gálico, rutina e ácido rosmarínico, entre outros (HALLIWELL et al. 1995).

Devido a sua composição rica em antioxidantes, o consumo de alimentos naturais é associado à ação antioxidante *in vivo*, bem como à redução na incidência de doenças crônicas e cardiovasculares, associadas ao estresse oxidativo (DAI; MUMPER, 2010; HARASYM; OLEDZKI, 2014; HUNG et al., 2004; STEER et al., 2002; TRIPATHI; MOHAN; KAMAT, 2007). Tulipani et al. (2011) sugerem que o consumo regular de morango, rico em antioxidantes, pode exercer uma melhora no nível antioxidante do plasma sanguíneo e um aumento na defesa anti-hemolítica em eritrócitos humanos. Hung et al. (2004) observaram que o consumo total de frutas e vegetais pelo grupo de pessoas em estudo foi inversamente associado ao risco de doenças cardiovasculares, mas não encontraram relação com a incidência de câncer. Por outro lado, em revisão realizada por Dai e Mumper (2010) estão apresentados vários estudos que já mostraram que plantas ricas em compostos fenólicos possuem propriedades anticâncer.

A ação antioxidante de folhas de plantas é atribuída principalmente à sua composição rica em compostos fenólicos, inclusive flavonoides. Quimicamente, os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (Figura 8). Dentre os tipos de compostos fenólicos existentes, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007; CROFT, 1998). Estes compostos possuem importante potencial antioxidante, principalmente devido a sua estrutura, ideal para o sequestro de radicais livres, no qual os polifenóis podem evitar reações em cadeia (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; DAI; MUMPER, 2010; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos, inclusive dos

flavonoides, depende do número de hidroxilas em sua estrutura e de sua interação com biomembranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Figura 8 – Estrutura química básica dos (A) compostos fenólicos e (B) flavonoides

Fontes:

(A) ALVES, L. **Fenóis**. Disponível em: <<http://www.brasile scola.com/quimica/fenois.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

(B) ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

Neste contexto, plantas são utilizadas como terapia medicinal por todo o mundo durante séculos, principalmente suas folhas. Inúmeros estudos demonstram a atividade antioxidante de folhas de diferentes espécies de plantas (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005; KATALINIC et al., 2006; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004; PORT'S et al., 2013; ROBY et al., 2013; SINDHI et al., 2013; SU; SHYU; CHIEN, 2008), bem como os efeitos positivos da adição de extratos de folhas como antioxidantes em alimentos (KIM; CHO; HAN, 2013; NASSU et al., 2003; SAMPAIO et al., 2012; SHAN et al., 2009; TRINDADE; MANCINI-FILHO; VILLAVICENCIO, 2010). Dentre as inúmeras folhas de plantas estudadas e que possuem relevante importância, encontram-se as de oliveira (*Olea europaea* L.) (LEE; LEE, 2010; SONI et al., 2006).

3.5 *OLEA EUROPAEA* L.

A *Olea europaea* L., árvore pertencente à família *Oleaceae* (Figura 9), conhecida como oliveira, possui grande importância histórica e comercial, e seu cultivo ocorre em regiões de climas temperados e tropicais, principalmente em países mediterrâneos (BIANCO; RAMUNNO, 2006). Trata-se de uma das árvores frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem, e seu cultivo remonta mais de 6.000 anos atrás (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009). O óleo extraído do fruto da oliveira, azeitona, que dá origem ao azeite de oliva, é o principal produto comercialmente obtido da oliveira. Segundo dados do

International Olive Council (IOC) (2015), a produção mundial estimada de óleo de oliva entre 2014/2015 é de 2,4 milhões de toneladas, sendo que aproximadamente 60 % é produzido por países da União Europeia. No Brasil, o cultivo de oliveira foi introduzido desde o período colonial, porém, apenas no último século iniciaram-se cultivos comerciais em quase todos os estados, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (Minas Gérias, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (COUTINHO; RIBEIRO; CAPPELLARO, 2009). Apesar disto, a produção de azeite de oliva no Brasil é muito pequena em comparação com o consumo, portanto, o país é dependente da importação de azeitonas e azeite (BERTONCINI, 2012).

Figura 9 – Árvore da oliveira (*Olea europaea* L.)

Fonte: TORNQUIST. **Olive tree 1**. Disponível em: < <http://tornquist.deviantart.com/art/Olive-tree-1-296631636>>. Acesso em: 08 nov. 2015

O óleo de oliva, característico da dieta mediterrânea, é largamente conhecido por seus efeitos antioxidantes e outros benefícios à saúde, atribuídos principalmente à presença de compostos fenólicos, com importantes atividades biológicas (GHANBARI et al., 2012; KHALATBARY, 2013; OLIVERAS-LÓPEZ et al., 2013, 2014; TAAMALLI et al., 2012; VISIOLI; BELLOMO; GALLI, 1998; VISIOLI; GALLI, 1998). Desta forma, são inúmeros os estudos relacionados ao óleo de oliva e suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, dentre outras, no entanto, outras partes da oliveira também são conhecidas por seus efeitos funcionais, tais como as folhas (GHANBARI et al., 2012). Nos últimos anos, houve um aumento nos estudos com folhas de oliveira e sua composição rica em compostos fenólicos com propriedades antioxidantes (ERBAY; ICIER, 2010; GOULAS et al., 2010; GUINDA et

al., 2015; LOCKYER et al., 2012; RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015; TÓTH et al., 2015).

3.5.1 Folhas de *Olea europaea* L.

As folhas de oliveira (Figura 10) têm sido utilizadas, historicamente, em países mediterrâneos, no tratamento de febre e outras doenças como a malária (GHANBARI et al., 2012). Recentes estudos com oliveiras mostram que suas folhas possuem elevados conteúdos de compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos, com diversos efeitos biológicos, incluindo efeito antioxidante (ORAK; ISBILIR; YAGAR, 2012; PARK et al., 2013), antimicrobiano (PEREIRA et al., 2007; SUDJANA et al., 2009), antiviral, anti-inflamatório (CVJETICANIN et al., 2010), cardioprotetor (LOCKYER et al., 2012) e regulador de pressão sanguínea (DEKANSKI et al., 2014; NEKOOEIAN et al., 2011) e colesterol (OMER et al., 2012) em animais (BOUAZIZ; SAYADI, 2005; EL; KARAKAYA, 2009; ERBAY; ICIER, 2010). Desta forma, há um grande potencial de utilização de folhas de oliveira na área médica, farmacêutica, cosmética e de alimentos, como aditivos alimentares, e por isto os estudos científicos com folhas de oliveira e seus extratos se intensificaram nos últimos dez anos (ERBAY; ICIER, 2010; GUINDA et al., 2015; LOCKYER et al., 2012; RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015; RODRIGUES; PIMENTEL; OLIVEIRA, 2015).

Figura 10 – Folhas frescas de *Olea europaea* L.

Fonte: NUTRA GREEN BIOTECHNOLOGY. **Olive leaf extract**. 2014. Disponível em: <<http://www.nutragreenbio.com/product/olive-leaf-extract>>. Acesso em: 08 nov. 2015.

Os efeitos biológicos das folhas de oliveira são atribuídos aos compostos fenólicos presentes em sua composição (BIANCO; RAMUNNO, 2006; ERBAY; ICIER, 2010; GOULAS et al., 2010; GUINDA et al., 2015). Estudos já identificaram uma variedade de diferentes tipos de compostos fenólicos presentes em folhas de oliveira, incluindo álcoois fenólicos, derivados secoiridoides, ácidos fenólicos, lignanas e flavonoides (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2014), cujas ocorrências e concentrações variam em função de diversas condições, como tipo de cultivar da oliveira, região e clima de cultivo, sazonalidade da colheita, entre outras (BILGIN; SAHIN, 2013; BRAHMI et al., 2013; FERREIRA et al., 2007; GOULAS et al., 2010; LAGUERRE et al., 2009; ORAK; ISBILIR; YAGAR, 2012; PAPOTI; TSIMIDOU, 2009; SCOGNAMIGLIO et al., 2012; TALHAOUY et al., 2014).

Benavente-García et al. (2000) avaliaram quantitativamente a composição em fenólicos de extrato de folhas de oliveira obtidos de cinco cultivares, cujas concentrações estão apresentadas na Tabela 2. Os resultados obtidos indicam claramente que o composto mais abundante encontrado foi oleuropeína, seguido de hidroxitirosol, luteolina-7-glicosídeo, apigenina-7glicosídeo e verbascosídeo, cujas estruturas químicas encontram-se na Figura 11. Outros estudos também observaram que a oleuropeína é o fenólico mais abundante em extratos de folhas de oliveira (AHMAD-QASEM et al., 2013a; HAYES et al., 2011b; KIRITSAKIS et al., 2010; LEE et al., 2009; XIE et al., 2015a).

Tabela 2 – Conteúdo dos principais compostos fenólicos presentes em extrato de folhas de oliveira

Fenólicos	Conteúdo % (base seca)
Hidroxitirosol	1,46
Tirosol	0,71
Catequina	0,04
Ácido cafeico	0,34
Ácido vanílico	0,63
Vanilina	0,05
Rutina	0,05
Luteolina-7-glicosídeo	1,38
Verbascosídeo	1,11
Apigenina-7glicosídeo	1,37
Diosmetina-7-glicosídeo	0,54
Oleuropeína	24,54
Luteolina	0,21
Diosmetina	0,05

Fonte: BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v.68, p.457-462, 2000.

Figura 11 – Estrutura química dos compostos fenólicos mais abundantes em extratos de folhas de oliveira

Fonte: BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v.68, p.457-462, 2000.

A oleuropeina é um glicosídeo secoiridoide fenólico, cuja estrutura química é constituída de um polifenol, conhecido como hidroxitirosol, um secoiridoide chamado ácido elenólico e uma molécula de glicose, conforme representado na Figura 12 (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2014). Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm relatado as propriedades fisiológicas funcionais da oleuropeina e seus derivados, como o hidroxitirosol, incluindo atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, cardioprotetora, neuroprotetora, anti-câncer, entre outras (DE LEONARDIS et al., 2008; ERBAY; ICIER, 2010; HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2014; LOCKYER et al., 2012; OMAR, 2010; PAIVA-MARTINS et al., 2010; ZARE et al., 2012). Além disto, De Bock et al. (2013) mostraram que metabólitos conjugados de hidroxitirosol são os principais metabólitos fenólicos encontrados em plasma e urina humanos após ingestão de extrato de folhas de oliveira, rico em oleuropeina e hidroxitirosol.

Figura 12 – Estrutura química da oleuropeína

Fonte: adaptado de XIE, P-J. et al. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. **Food and Bioproducts Processing**, v.93, p.29–38, 2015b.

Os compostos fenólicos podem ser obtidos das folhas de oliveira por diferentes métodos de extração, com diferentes tipos de solventes (ABAZA et al., 2011; AHMAD-QASEM et al., 2013b; BILGIN; SAHIN, 2013; BRAHMI et al., 2012; MALIK; BRADFORD, 2008; MYLONAKI et al., 2008). De maneira geral, a utilização de metanol/água como solvente mostra-se bastante eficiente, devido a maior quantidade de polifenóis extraídos (ABAZA et al., 2011; BRAHMI et al., 2012).

Estudos com extratos de folhas de oliveira demonstram efetiva atividade antioxidante frente a diferentes métodos de determinação *in vitro* (KONTOGIANNI; GEROTHANASSIS, 2012; ORAK; ISBILIR; YAGAR, 2012). Benavente-García et al. (2010) observaram uma capacidade antioxidante equivalente em trolox de extrato de folhas de oliveira maior que a observada para oleuropeína, hidroxitirosol e outros compostos fenólicos puros, e sugeriram que isto se deve a um efeito sinérgico que os compostos fenólicos exercem no extrato de folhas de oliveira. Orak, Isbilir e Yagar (2012) observaram que nas mesmas concentrações, extrato de folhas de oliveira apresentou maior atividade sequestradora do radical DPPH[•] que os antioxidantes butil hidroxitolueno (BHT) e butil hidroxianisol (BHA), enquanto que a atividade sequestradora de ânion superóxido foi próxima a do BHA. Da mesma forma, Lee et al. (2009) obtiveram valor de atividade antioxidante para extrato de folhas de oliveira maiores que para BHT, porém pouco menores em comparação com α -tocoferol.

Similarmente, estudos mostram efeitos benéficos da suplementação de animais com folhas de oliveira, ou seus principais fenólicos isolados, em suas características fisiológicas e bioquímicas (DEKANSKI et al., 2014; JEMAI et al., 2008; NEKOOEIAN et al., 2011;

PAIVA-MARTINS et al., 2009b, 2014), bem como na estabilidade oxidativa dos produtos obtidos destes animais, como, por exemplo, carnes e ovos (BOTSOGLOU et al., 2010, 2013; GOVARIS et al., 2010; PAIVA-MARTINS et al., 2009b). Porém, poucos estudos avaliam a aplicação direta de extratos de folhas de oliveira como aditivos em alimentos, mesmo diante do potencial já observado (HAYES et al., 2011a).

4 METODOLOGIA

O desenvolvimento experimental deste estudo foi realizado no Laboratório de Química Biológica do Departamento de Ciências Básicas (ZAB), na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) na Universidade de São Paulo (USP) em Pirassununga/SP (Brasil). Apenas as análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica foram realizadas, respectivamente, nos Laboratórios Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (Departamento de Engenharia de Alimentos – ZEA), Multiusuário de Análise de Alimentos (ZEA) e Fisiologia Animal (ZAB), na mesma faculdade.

4.1 MATERIAIS

As folhas secas e micronizadas de *Olea europaea* L. (oliveira) foram obtidas da empresa *Folhas de Oliva*® (Estiva Gerbi, São Paulo, Brasil). Os padrões ácido L-ascórbico, trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), ácido gálico e quercetina, e todos os demais reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico, obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, o solvente metanol e o padrão oleuropeína utilizados foram de grau HPLC, obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

4.2 PREPARO DO EXTRATO DE FOLHAS DE OLIVEIRA

O extrato de folhas de oliveira para utilização neste estudo foi preparado em seis repetições independentes, de acordo com esquema representativo na Figura 13. Para obtenção do extrato, 10 g de amostra seca de folhas, previamente micronizadas, foram submetidas à remoção de compostos solúveis em hexano com 300 mL de *n*-hexano, em extrator convencional tipo Soxhlet, por 6 horas, conforme descrito por Guinda et al. (2002) e Virost et al. (2007). Este processo de remoção de compostos solúveis em hexano, incluindo lipídios, foi realizado a fim de permitir a obtenção de um extrato de completa solubilização em meio aquoso. Posteriormente foi realizada extração dos compostos com 200 mL de metanol/água (80/20 %, v/v) sob agitação (170 rpm) (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil) e protegida de luz, à temperatura ambiente, por 24 horas (ABAZA et al., 2011; BOUAZIZ; SAYADI, 2005). Após extração, a solução foi centrifugada a 4000 rpm (Centrífuga CT-5000, Cientec, Brasil) por 10

minutos para obtenção do sobrenadante, que foi filtrado com filtro Whatman n.1 (11 µm). O metanol presente no extrato foi removido sob pressão reduzida (Evaporador rotativo SL-126, Solab, Brasil) em temperatura não superior a 50 °C.

Figura 13 – Fluxograma representativo do processo de obtenção do extrato de folhas de oliveira (EFO)

Fonte: Própria autoria

Após remoção do metanol, o extrato concentrado foi diluído em água (volume final 200 mL) e sonicado (Desruptor de células ultrassônico Unique, Brasil) em temperatura ambiente (2 ciclos de 20 segundos a 100 W de potência) para melhor dissolução, e, posteriormente, centrifugado a 4000 rpm (Centrífuga CT-5000, Cientec, Brasil) por 5 minutos, para retirada de compostos não solúveis em água. O sobrenadante foi congelado e posteriormente liofilizado (Liofilizador K-202, Liobras, Brasil) para obtenção do extrato seco de folhas de oliveira (EFO).

Para a realização das análises posteriores, o extrato seco foi diluído em tampão salino fosfato (PBS), pH 7,4, nas concentrações adequadas para cada ensaio. Para completa solubilização, foi homogeneizado em agitador por 2 minutos, e posteriormente sonicado (Desruptor de células ultrassônico Unique, Brasil) (3 ciclos de 20 segundos a 100 W de potência). Em todos os procedimentos as amostras foram mantidas em gelo e ao abrigo da luz.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

4.3.1 Determinação do poder redutor por Folin-Ciocalteu

O poder redutor do extrato sobre o reagente Folin-Ciocalteu, que estima o conteúdo de fenólicos totais, foi determinado conforme método colorimétrico descrito por Singleton e Rossi Junior (1965), com modificações. Esta análise estima o conteúdo de fenólicos totais da amostra, porém, também quantifica outros compostos com capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu, como açúcares, aminas aromáticas, ácido ascórbico, ácidos orgânicos, outras substâncias orgânicas não fenólicas e algumas substâncias inorgânicas (ANGELO; JORGE, 2007; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

O reagente Folin-Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico. Neste método, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, o molibdênio presente no reagente, que se encontra no estado de oxidação 6 (VI) (cor amarela), forma os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis, alterando o estado de oxidação do molibdênio por reação de transferência de elétrons (DE OLIVEIRA et al., 2009). Compostos fenólicos reagem com o reagente Folin-Ciocalteu apenas em meio básico, que neste caso é obtido com solução de carbonato de sódio (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Na Figura 14 está representada a desprotonação de um composto fenólico, ácido gálico, em meio

básico, gerando ânion fenolato, que reduz o molibdênio presente no reagente Folin-Ciocalteu, mudando a coloração de amarela para azul. A formação da coloração azul permite a determinação espectrofotométrica da concentração das substâncias redutoras.

Figura 14 – Reação do composto fenólico ácido gálico com molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu

Fonte: adaptado de DE OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

O extrato (0,2 mg/mL) foi incubado por 2 minutos com o reagente Folin-Ciocalteu, devidamente diluído em água ultra pura (1:9, v/v). Em seguida, foi adicionada solução aquosa de carbonato de sódio 7,5 % (m/v), e a absorbância a 760 nm foi determinada após 1 hora à temperatura ambiente (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA). Ácido gálico foi utilizado como composto padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (AGE), em mg/g de extrato seco, calculados a partir de curva padrão de ácido gálico (0,5 a 6,0 $\mu\text{g/mL}$).

4.3.2 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais do extrato foi determinado, em duplicata, de acordo com método descrito por Miliauskas, Venskutonis e van Beek (2004), com modificações. Este método espectrofotométrico baseia-se na utilização de uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3), no qual o íon alumínio (Al^{3+}) complexa-se com as moléculas de flavonoides, formando um complexo flavonoide- Al^{3+} estável de coloração amarela (Figura 15) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Esta complexação promove um deslocamento da banda de

absorção dos flavonoides para um comprimento de onda maior, no qual a intensidade espectrofotométrica é proporcional à concentração de flavonoides na amostra (MARQUES et al., 2012).

Figura 15 – Reação de complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl_3), com formação do complexo estável flavonoide- Al^{3+}

Fonte: MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer-Verlag, 1970.

O extrato (10 mg/mL) foi incubado com cloreto de alumínio 2 % (m/v) em etanol. A absorbância a 415 nm foi determinada após 40 minutos à temperatura ambiente (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA). Quercetina foi utilizada como composto padrão. Os resultados de flavonoides totais foram expressos em equivalente de quercetina (QE), em mg/g de extrato seco, calculados a partir de curva padrão de quercetina (0,6 a 9,6 $\mu\text{g/mL}$).

4.3.3 Determinação do conteúdo de oleuropeína por HPLC

O conteúdo de oleuropeína do extrato foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também conhecida pela sigla em inglês HPLC (*high performance liquid chromatography*), de acordo com métodos descritos por Altinyay e Altun (2006) e Tayoub et al. (2012), com modificações. O extrato seco foi diluído em metanol grau HPLC na concentração final de 10 mg/mL, e filtrado em filtro Whatman (0,45 μm). Um volume de 20 μL desta solução foi diretamente injetado no sistema de HPLC (Shimadzu, Japão) equipado com detector UV-visível a 280 nm e coluna Shim-pack CLC-ODS (5 μm) 4,6 x 250 mm,

precedida de pré-coluna Shim-pack (5 μ m) 4 x 10 mm (Shimadzu, Japão), à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi água + ácido fosfórico (0,1 %) como eluente A, e metanol como eluente (B), nas seguintes proporções: 60 % A, 40 % B. O fluxo foi de 1,0 mL/min, com tempo de retenção de 18 minutos e tempo de corrida 30 minutos, com detecção UV a 280 nm. Os resultados foram obtidos a partir de curva padrão com concentrações conhecidas do padrão oleuropeína (62,5 a 500 μ g/mL). Para avaliação dos resultados foi utilizado o Software LabSolutions (Shimadzu, Japão).

4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada, *in vitro*, por meio de análises que verificam o poder de redução sobre o íon férrico (FRAP) e seu efeito antioxidante sobre os radicais livres sintéticos DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS $^{++}$ [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e sobre espécies reativas que participam de processos oxidativos celulares: ânion superóxido, ácido hipocloroso e óxido nítrico.

4.4.1 Atividade antioxidante sobre radical DPPH $\cdot$

A atividade antioxidante sobre radical DPPH $\cdot$ foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Este método baseia-se na capacidade de redução de DPPH $\cdot$ pela amostra. O DPPH $\cdot$ é um radical orgânico de nitrogênio, estável e disponível comercialmente, de coloração púrpura, que possui pico de absorção no espectro ultravioleta (UV)/visível a 515 nm (Figura 16). Pela ação de um antioxidante, ocorre a redução do DPPH $\cdot$, formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela (Figura 17), que não absorve a 515 nm. Desta forma, a reação é monitorada espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorbância a 515 nm (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Figura 16 – Estrutura química do radical DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Fonte: PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.

Figura 17 – Reação de redução do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), de coloração púrpura, ao DPPH-H (2,2-difenilpicril-hidrazina), de coloração amarela, por um fenol

Fonte: adaptado de ANCEREWICZ, J. et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, n.1, p.113-120, 1998.

Existe na literatura grande variação nos tempos de incubação com o radical DPPH[•], uma vez que a estabilização da reação depende do tipo de amostra analisada e das condições utilizadas (BRAHMI et al., 2014; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995; FERREIRA et al., 2007; LEE et al., 2009; MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004). Portanto, antes do início das análises, foram realizados testes para acompanhar o decaimento da absorbância até atingir a estabilização e, desta forma, definiu-se como 3 horas o tempo de incubação da amostra com o radical DPPH[•] para garantir que a absorbância permaneça constante com o tempo.

Misturas reacionais contendo solução metanólica de DPPH[•] (65 µM) e diferentes concentrações de extrato (3,75 a 50,0 µg/mL) foram preparadas. Um ensaio controle (ausência de extrato) foi realizado para determinar o valor inicial de absorbância a 515 nm no tempo zero de reação. Após 3 horas de incubação a 25 °C, as absorbâncias das misturas reacionais foram determinadas a 515 nm (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA). Os ensaios foram realizados em duplicata. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão.

A atividade antioxidante da amostra foi avaliada por meio da redução na absorbância do DPPH[•] a 515 nm, comparado à absorbância inicial do ensaio controle (ausência de extrato). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de DPPH[•] conforme eq.(8).

$$\text{Inibição DPPH}^{\bullet} (\%) = [1 - (A_A/A_{Co})] \times 100 \quad (8)$$

Onde: A_{Co} é a absorbância a 515 nm do ensaio controle no tempo inicial (zero) e A_A é a absorbância a 515 nm das amostras após 3 horas de incubação.

A concentração de amostra (em $\mu\text{g/mL}$) que causa um decréscimo de 50 % na concentração inicial de DPPH $^{\bullet}$, definida como IC₅₀, foi calculada a partir dos valores de % de inibição em função das concentrações de amostras nos ensaios. TEAC, em mg/g de extrato seco, foi calculada a partir de curva padrão de trolox (0,32 a 6,3 $\mu\text{g/mL}$) obtida nas mesmas condições reacionais das amostras.

4.4.2 Atividade antioxidante sobre radical ABTS $^{+\bullet}$

A atividade antioxidante sobre radical ABTS $^{+\bullet}$ dos extratos foi determinada de acordo com Re et al. (1999), com modificações. Neste método, ABTS obtido comercialmente é oxidado por um agente oxidante, neste caso persulfato de amônio, e convertido ao radical cátion ABTS $^{+\bullet}$, que possui coloração azul intensa (Figura 18) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). A ação de um antioxidante é avaliada pelo decréscimo da coloração, pela habilidade de redução do cátion ABTS $^{+\bullet}$.

Figura 18 – Representação esquemática da reação de formação do radical cátion ABTS $^{+\bullet}$ a partir da oxidação do ABTS [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] na presença de persulfato de amônio

Fonte: adaptado de PANNALA, A.S. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.282, p.1161-1168, 2001.

O tempo necessário para estabilização da reação com o radical ABTS $^{+\bullet}$ depende do tipo de amostra analisada e das condições utilizadas (RE et al., 1999; ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009). Desta forma, Re et al. (1999) estimaram que o tempo de incubação deve

variar entre 1 a 6 minutos. Portanto, antes do início das análises, foram realizados testes para acompanhar o decaimento da absorbância até atingir a estabilização e, definiu-se como 6 minutos o tempo de incubação da amostra com o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ para garantir que a absorbância permaneça constante com o tempo.

A solução contendo o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi preparada a partir da reação de 7,0 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de amônio por 12 a 16 horas, no escuro e em agitação constante (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil), à temperatura ambiente. Para determinar a atividade antioxidante, a solução estoque de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída em etanol para se obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 750 nm. Misturas reacionais contendo diferentes concentrações dos extratos (3,33 a 33,3 $\mu\text{g/mL}$) e 950 μL da solução $\text{ABTS}^{\bullet+}$ diluída foram preparadas em volumes finais de 1,0 mL. Um ensaio controle (ausência de extrato) foi realizado para determinar o valor inicial de absorbância a 750 nm no tempo zero de reação. Após 6 minutos de incubação na ausência de luz, em temperatura ambiente, as absorbâncias das misturas reacionais foram determinadas a 750 nm (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA). Os ensaios foram realizados em duplicata. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão.

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada por meio da redução na absorbância a 750 nm, comparado à absorbância inicial do ensaio controle (ausência de extrato). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ conforme eq.(9).

$$\text{Inibição } \text{ABTS}^{\bullet+} (\%) = [1 - (A_A/A_{C0})] \times 100 \quad (9)$$

Onde: A_{C0} é a absorbância a 750 nm do ensaio controle no tempo inicial (zero) e A_A é a absorbância a 750 nm das amostras após 6 minutos de incubação.

A concentração de amostra (em $\mu\text{g/mL}$) que causa um decréscimo de 50 % na concentração inicial de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, definida como IC_{50} , foi calculada a partir dos resultados de porcentagens de inibição em função das concentrações de amostras nos ensaios. TEAC, em mg/g de extrato seco, foi calculada a partir de curva padrão de trolox (0,6 a 4,2 $\mu\text{g/mL}$) obtida nas mesmas condições reacionais das amostras.

4.4.3 Determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP)

A determinação do poder de redução do íon férrico foi conduzida de acordo com Benzie e Strain (1996), com modificações. Este método baseia-se na redução do complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{III} -TPTZ) ao complexo ferroso (Fe^{II} -TPTZ), por um agente antioxidante, em pH baixo (Figura 19). O complexo ferroso formado possui coloração azul intensa, que pode ser monitorado a 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

Figura 19 – Representação esquemática da reação de redução do complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{III} -TPTZ) ao complexo ferroso (Fe^{II} -TPTZ) por um agente antioxidante

Fonte: HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.1841-1856, 2005.

O reagente FRAP foi preparado a partir de solução de tampão acetato 300 mM (pH 3,6, ajustado com ácido acético glacial), solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM (em HCl 40 mM) e solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM), nas proporções volumétricas de 10:1:1, respectivamente. Um volume de 50 μL de amostra (0,2 g/mL) foi incubado com 950 μL do reagente FRAP. A absorbância a 593 nm foi determinada após 30 minutos a 37 °C (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA). De acordo com Thaipong et al. (2006), uma curva padrão foi preparada com trolox em diferentes concentrações (0,63 a 3,78 $\mu\text{g/mL}$), e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente em trolox (TEAC), em mg/g de extrato seco. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.4.4 Atividade antioxidante sobre ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

A atividade antioxidante do extrato sobre ânion superóxido foi determinada com base em metodologia proposta por Ewing e Janero (1995), adaptada por Valentão et al. (2001) e

Orak, Isbilir e Yagar (2012), com algumas modificações. Este método baseia-se na geração de radicais ânions superóxido pela reação entre fenazina metassulfato (PMS) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), na presença de oxigênio. Os radicais superóxido formados reduzem o azul nitro tetrazolio (NBT) presente no meio ao cromógeno azul formazana, que pode ser monitorado espectrofotometricamente (DE OLIVEIRA et al., 2009). Quando há a presença de um antioxidante no meio, este compete com o NBT pelo ânion superóxido gerado, diminuindo, desta forma, a redução do NBT e, conseqüentemente, a formação de formazana. As reações envolvidas nesta metodologia estão representadas esquematicamente na Figura 20.

Figura 20 – Representação esquemática das reações envolvidas na metodologia de atividade antioxidante sobre radical ânion superóxido e ação de um antioxidante presente no meio

Fonte: DE OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

As misturas reacionais em poços de microplacas continham, em um volume final de 300 μ L: NADH (166 μ M), NBT (43 μ M), extratos em diferentes concentrações (20 a 160 μ g/mL) e PMS (2,7 μ M). Todos os reagentes foram preparados em tampão salino fosfato pH 7,4. Após incubação por 2 minutos a 25 $^{\circ}$ C, as absorvâncias foram determinadas a 540 nm em leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). Os ensaios foram realizados

em duplicata. O antioxidante comercial ácido ascórbico foi utilizado como composto de referência. Um ensaio controle (ausência de extrato) foi realizado nas mesmas condições descritas, para cálculo de porcentagem de inibição de ânion superóxido, conforme eq.(10).

$$\text{Inibição } O_2^{\bullet-} (\%) = [1 - (A_A/A_C)] \times 100 \quad (10)$$

Onde: A_C é a absorbância do ensaio controle a 540 nm e A_A é a absorbância das amostras a 540 nm.

A concentração de amostra (em $\mu\text{g/mL}$) que causa uma inibição de 50 % de ânion superóxido, definida como IC_{50} , foi calculada a partir dos resultados de % de inibição em função das concentrações de amostras nos ensaios.

4.4.5 Atividade antioxidante sobre ácido hipocloroso (HOCl)

A atividade antioxidante do extrato sobre ácido hipocloroso foi determinada de acordo com Ching, de Jong e Bast (1994) e Valentão et al. (2002), com modificações. Este método baseia-se na oxidação de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) a ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) por HOCl (CHING; DE JONG; BAST, 1994). O TNB absorve em comprimento de onda de 412 nm e o DTNB em 325 nm, portanto, na presença de HOCl, a absorbância a 412 nm diminui enquanto a absorbância a 325 nm aumenta. Desta forma, quando há a presença de um antioxidante no meio, este compete com o TNB pelo HOCl, e ocorre uma menor taxa de oxidação de TNB a DTNB, e portanto, uma menor redução da absorbância a 412 nm. As reações envolvidas nesta metodologia estão representadas esquematicamente na Figura 21.

Figura 21 – Representação esquemática da oxidação de 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) a ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) por ácido hipocloroso (HOCl) e ação de um antioxidante

Fonte: Própria autoria

Para desenvolvimento da análise, a síntese de ácido hipocloroso foi realizada imediatamente antes do uso, conforme descrito por Neergeen et al. (2006), ajustando-se uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (1 % v/v) para pH 6,2 com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,6 M. A concentração da solução de HOCl foi determinada espectrofotometricamente a 235 nm (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA) pelo coeficiente de extinção molar de 100 M⁻¹cm⁻¹ (ARUOMA, 1994; WEISS et al., 1982). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, em cubetas, contendo 62,5 µM de TNB, solução previamente preparada conforme descrito por Ching, de Jong e Bast (1994), e diferentes concentrações de amostra (100 a 1400 µg/mL). A absorbância a 412 nm (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA) foi determinada antes e 5 minutos após a adição de HOCl 40 µM (concentração final na cubeta). Os ensaios foram realizados em duplicata. O antioxidante comercial ácido ascórbico foi utilizado como composto de referência. Um ensaio controle (ausência de extrato) foi realizado nas mesmas condições descritas, para cálculo de porcentagem de inibição de ácido hipocloroso, conforme eq.(11).

$$\text{Inibição HOCl (\%)} = [1 - (A_{Ai} - A_{Af}) / (A_{Ci} - A_{Cf})] \times 100 \quad (11)$$

Onde: A_{Ai} é a absorbância da amostra antes da adição de HOCl (inicial); A_{Af} é a absorbância da amostra após 5 minutos da adição de HOCl (final); A_{Ci} é a absorbância do controle antes da adição de HOCl e A_{Cf} é a absorbância do controle após 5 minutos da adição de HOCl.

A concentração de amostra (em µg/mL) que causa uma inibição de 50 % de ácido hipocloroso, definida como IC₅₀, foi calculada a partir dos resultados de % de inibição em função das concentrações de amostras nos ensaios.

4.4.6 Atividade antioxidante sobre óxido nítrico (NO[•])

A atividade antioxidante do extrato sobre óxido nítrico foi determinada de acordo com Marcocci et al. (1994) e Yen, Lai e Chou (2001), com modificações de Pooja, Samanta e Garg (2010), baseados na Reação de Griess (GRIESS, 1879). Este método consiste em reações que envolvem íons nitrito (NO₂⁻), produtos estáveis da degradação de NO[•], altamente instável, e por isto, podem ser considerados como índice de produção de óxido nítrico.

Em pH fisiológico, o óxido nítrico gerado em solução aquosa de nitroprussiato de sódio (NPS) interage com oxigênio e produz NO₂⁻, que pode ser quantificado pela Reação de

Griess (MARCOCCI et al., 1994). A Reação de Griess baseia-se na diazotização do NO_2^- com sulfanilamida, em condições ácidas, e subsequente ligação com N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), formando um cromóforo de coloração vermelho violeta, que absorve em comprimento de onda de 540 nm (TSIKAS, 2007). As reações envolvidas no método de Griess estão representadas esquematicamente na Figura 22. Quando um sequestrador de $\text{NO}^\bullet$ está presente em solução aquosa com NPS, há uma menor formação de NO_2^- , e consequentemente, menor absorbância a 540 nm após Reação de Griess.

Figura 22 – Representação esquemática da Reação de Griess

Fonte: RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Química Nova*, v.29, n.5, p.1114-1120, 2006.

A formação de NO_2^- , e consequentemente nitrito de sódio, foi realizada pela incubação a 25 °C por 3 horas de misturas reacionais contendo solução de NPS 8,3 mM (em PBS, pH 7,4), preparada imediatamente antes do uso, e diferentes concentrações de amostra (10 a 200 $\mu\text{g/mL}$). Um ensaio controle (ausência de extrato) foi realizado nas mesmas condições descritas. A cada 1 hora, alíquotas de 50 μL das misturas reacionais foram coletadas e adicionadas de 50 μL de sulfanilamida (1 % em ácido fosfórico) e, após 5 minutos, de 50 μL de NED (0,1 %), ambos reagentes preparados conforme descrito por Yen, Lai e Chou (2001). Após 5 minutos, as absorbâncias foram determinadas a 540 nm em leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). Os ensaios foram realizados em duplicata. A concentração de nitrito de sódio (μM) nas misturas reacionais, a cada 1 hora de

ensaio, foi calculada a partir de curva padrão, obtida pela reação de diferentes concentrações de nitrito de sódio (1,56 a 100 μM) com sulfanilamida e NED nas mesmas condições descritas para as amostras. O antioxidante comercial ácido ascórbico foi utilizado como composto de referência.

Para cálculo de porcentagem de inibição de óxido nítrico pelas amostras, foram consideradas as absorbâncias obtidas em 2 horas de incubação das misturas reacionais, conforme eq.(12).

$$\text{Inibição NO}\cdot (\%) = [1 - (A_A/A_C)] \times 100 \quad (12)$$

Onde: A_C é a absorbância do ensaio controle a 540 nm e A_A é a absorbância das amostras a 540 nm.

A concentração de amostra (em $\mu\text{g/mL}$) que causa uma inibição de 50 % de óxido nítrico, definida como IC_{50} , foi calculada a partir dos resultados de % de inibição em função das concentrações de amostras nos ensaios.

4.5 AVALIAÇÃO DE EFEITO PROTETOR SOBRE DANOS OXIDATIVOS INDUZIDOS POR RADICAL LIVRE EM ERITRÓCITOS HUMANOS

O efeito protetor do extrato sobre dano oxidativo celular foi avaliado, *in vitro*, por meio da proteção sobre hemólise, peroxidação lipídica e oxidação de hemoglobina induzidos por AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido) em eritrócitos humanos. Além disto, o efeito protetor do extrato foi avaliado visualmente através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O AAPH é um composto azo hidrossolúvel que sofre decomposição térmica em temperatura fisiológica, na presença de oxigênio, gerando radicais livres peroxil (Figura 23), que causam danos oxidativos celulares. Eritócitos são muito susceptíveis a danos oxidativos, pelo alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados de suas membranas e altas concentrações celulares de oxigênio e hemoglobina (YANG et al., 2006). Desta forma, radicais peroxil gerados na decomposição de AAPH atacam as membranas celulares de eritrócitos pela indução da peroxidação lipídica e alterações conformacionais de proteínas, podendo levar ao processo de hemólise (SATO et al., 1995). Este modelo biológico tem sido amplamente utilizado como fonte de radicais livres e como alvo de danos oxidativos em estudos de efeito protetor de compostos e extratos em geral.

Figura 23 – Reação de decomposição térmica de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH), com geração de radicais peroxil na presença de oxigênio

Fonte: KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v.26, p.459-516, 2005.

4.5.1 Obtenção de eritrócitos humanos

Os eritrócitos foram obtidos a partir de coletas de sangue venoso de pessoas saudáveis e não fumantes, sem que estas pessoas tenham recebido nenhum tipo de tratamento ou intervenção. Os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), previamente aprovado pelo Comitê Local de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (Parecer nº 493.382, Anexo A). As coletas foram realizadas por profissional habilitado na Unidade Básica de Saúde (UBAS) do campus “Fernando Costa” de Pirassununga, da Universidade de São Paulo (USP). As amostras de sangue (10 mL) foram coletadas em tubos tipo *vacutainer*, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante.

4.5.2 Preparo da suspensão de eritrócitos

A solução de eritrócitos foi preparada de acordo com descrito por Gião et al. (2010). As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 rpm (2332 g) por 10 minutos (Centrífuga CT-5000, Cientec, Brasil). Uma representação esquemática da composição do sangue após centrifugação está apresentada na Figura 24. O plasma sanguíneo e a camada celular superior, rica em leucócitos, foram removidos, por aspiração com micropipeta, e descartados. A camada inferior, constituída por eritrócitos, foi adicionada de tampão salino fosfato pH 7,4 e posteriormente centrifugada a 3.500 rpm (2332 g) por 10 minutos (Centrífuga CT-5000, Cientec, Brasil). O sobrenadante foi removido e os eritrócitos foram lavados mais duas vezes com PBS. Finalmente, os eritrócitos foram resuspendidos em PBS, de modo a se obter 10 % hematócrito, verificada em capilares de vidro a 11.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga para microhematócrito microprocessada, Q222HM2, Quimis, Brasil), o que equivale

aproximadamente a $1,1 \times 10^9$ cél/mL (VALLADA, 1997). A suspensão final de eritrócitos foi mantida a 4 °C e utilizada imediatamente após seu preparo.

Figura 24 – Representação esquemática da composição do sangue após centrifugação do sangue coletado

Fonte: adaptado de CUMMINGS, B. Disponível em: <<http://fau.pearlshes.com/anatomy/Chapter%2029/Chapter%2029.htm>>. Acesso em: 07 nov. 2015.

4.5.3 Efeito sobre hemólise

A análise da ação do extrato sobre hemólise induzida por AAPH foi realizada conforme descrito por Simão et al. (2006) e Yang et al. (2006), com modificações. Este método baseia-se na indução de hemólise dos eritrócitos por radicais peroxil gerados na decomposição térmica de AAPH. A hemólise é avaliada espectrofotometricamente pela liberação de hemoglobina das células, com pico de absorção em 540 nm. Na presença de um antioxidante que atua sobre os radicais peroxil, há menor ocorrência de hemólise, e consequentemente menor absorção a 540 nm.

Misturas reacionais contendo suspensão de eritrócitos 1 % hematócrito foram pré-incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações de amostra (1 a 25 µg/mL) a 37 °C por 30 minutos, sob agitação de 100 rpm (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil). Após pré-incubação, as misturas reacionais foram incubadas na ausência e presença de 5 mM de AAPH (em PBS, pH 7,4) a 37 °C por 6 horas, nas mesmas condições de agitação. Os ensaios na ausência de AAPH foram feitos para avaliar se a amostra causava hemólise dos eritrócitos ou se havia alguma interferência do extrato nos resultados. O antioxidante comercial ácido ascórbico foi utilizado como composto de referência. Os ensaios foram realizados em duplicata.

O grau de hemólise foi determinado a cada 1 hora de incubação, pela liberação de hemoglobina das células, centrifugando-se alíquotas do meio reacional, diluídas 2,5 vezes em PBS, a 5.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga CT-14000, Cientec, Brasil), com determinação espectrofotométrica do sobrenadante a 540 nm (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA). Hemólise completa (100 %) foi estabelecida com a incubação de eritrócitos 1 % em água a 37 °C por 10 minutos.

Os resultados foram expressos em % de hemólise, de acordo com a eq.(13), e em % de inibição de hemólise em relação ao ensaio controle, de acordo com a eq.(14).

$$\text{Hemólise (\%)} = (A_A/A_{100\%}) \times 100 \quad (13)$$

$$\text{Inibição Hemólise (\%)} = [1 - (A_A/A_C)] \times 100 \quad (14)$$

Onde: A_A é a absorbância dos ensaios com as amostras a 540 nm; $A_{100\%}$ é a absorbância do ensaio de hemólise completa (100 %) a 540 nm e A_C é a absorbância do ensaio controle (ausência de amostra) a 540 nm.

A concentração de amostra (em µg/mL) que causa uma inibição de 50 % na hemólise induzida por AAPH, definida como IC_{50} , foi calculada a partir dos resultados de % de inibição, em 4 horas de incubação, em função das concentrações de amostras nos ensaios.

4.5.3.1 Avaliação por microscopia

Para avaliar os efeitos hemolíticos por microscopia, foram realizadas análises de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) do efeito protetor do extrato sobre os eritrócitos após danos oxidativos induzidos por AAPH. Para tanto, foram realizados ensaios com maior concentração do oxidante AAPH (10 mM) a fim de potencializar os efeitos e consequentemente a visualização. Misturas reacionais contendo suspensão de eritrócitos 1 % hematócrito foram pré-incubadas em PBS na ausência (controle) e presença de 25 ou 50 µg/mL de EFO a 37 °C por 30 minutos, sob agitação de 100 rpm (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil). Após a pré-incubação com o extrato, as misturas reacionais foram incubadas por mais 4 horas, nas mesmas condições, na ausência e presença de 10 mM de AAPH.

Para avaliar a hemólise por microscopia óptica, caracterizada pela redução na densidade de hemácias, alíquotas (10 µL) foram retiradas dos ensaios no final da incubação e colocadas em câmaras de Neubauer para visualização (Microscópio trinocular Axio

Scope.A1, Carl Zeiss, Alemanha) (PAIVA-MARTINS, 2009a). As imagens foram capturadas utilizando o Software AxioVision LE (Carl Zeiss, Alemanha).

Para avaliar as alterações morfológicas dos eritrócitos por MEV foi empregada metodologia conforme descrita por Pereira, Hatayde e Faria (2011) e Suwalsky et al. (2009), com modificações. Após incubação, os ensaios foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos (Centrífuga CT-5000, Cientec, Brasil) e, após descarte do sobrenadante, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5 % (em PBS), pH 7,4, por 17 horas a 4 °C. Posteriormente, a solução foi novamente centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos (Centrífuga CT-5000, Cientec, Brasil) para remoção do sobrenadante. As células foram lavadas com PBS três vezes e desidratadas com sucessivas lavagens em série ascendente de acetona (25 %, 50 %, 75 %, 95 % (v/v): 10 min/cada, e 99,5 % (v/v): 10 min/cada por 2 vezes). Alíquotas (20 µL) foram depositadas em lâmina de vidro, secas em temperatura ambiente, colocadas em porta amostras com fita adesiva condutiva de carbono e examinadas em MEV (Microscópio eletrônico de varredura, TM3000, Hitachi, Japão) em voltagem de 15 kV e magnitude de 1.000–10.000×. As imagens foram registradas pelo próprio equipamento.

4.5.4 Efeito sobre peroxidação lipídica

A ação do extrato sobre peroxidação lipídica em eritrócitos expostos ao AAPH foi avaliada indiretamente pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Sato et al. (1995), Simão et al. (2006) e Chisté et al. (2014), com modificações. Este método consiste na determinação espectrofotométrica de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, e outras substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A reação de MDA ou de outras substâncias com ácido tiobarbitúrico (TBA), em condições ácidas, forma um cromógeno rosado, com absorção em 532-535 nm (Figura 25). A intensidade de absorção indica a extensão da peroxidação lipídica, quando comparada ao ensaio controle (ausência de AAPH). Na presença de um antioxidante, a peroxidação lipídica de eritrócitos é reduzida e consequentemente ocorre menor formação de MDA e outros produtos da oxidação e, portanto, após reação com TBA há uma redução na absorbância.

Figura 25 – Reação envolvida na metodologia de análise de peroxidação lipídica, entre malondialdeído e ácido tiobarbitúrico (TBA), com formação de um cromógeno

Fonte: adaptado de ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183-198, 2002.

Misturas reacionais contendo suspensão de eritrócitos 5 % hematócrito foram pré-incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações de amostra (25 a 250 $\mu\text{g/mL}$) a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, sob agitação de 100 rpm (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil). Após pré-incubação, as misturas reacionais foram expostas a 50 mM de AAPH (em PBS, pH 7,4) a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 4 horas, sob as mesmas condições de agitação. As condições de concentração de eritrócitos e AAPH utilizadas neste ensaio estão de acordo com os melhores parâmetros experimentais obtido por Chisté et al. (2014) para este tipo de análise. O antioxidante comercial ácido ascórbico foi utilizado como composto de referência. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A cada 1 hora de incubação, alíquotas das misturas reacionais foram colhidas e adicionadas de ácido tricloroacético (TCA) 12 % (na proporção de 2,5:1) e, após homogeneização vigorosa, centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos (Centrífuga CT-14000, Cientec, Brasil). Posteriormente, o sobrenadante e solução de TBA 0,7 % (na proporção de 1:1,25) foram incubados a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Após 5 minutos em gelo para interromper a reação, a absorbância foi determinada a 535 nm (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA).

A porcentagem de inibição de peroxidação lipídica dos eritrócitos pelo extrato, em relação ao ensaio controle (ausência de extrato), foi calculada conforme eq.(15).

$$\text{Inibição peroxidação lipídica (\%)} = [1 - (A_A/A_C)] \times 100 \quad (15)$$

Onde: A_C é a absorbância do ensaio controle a 535 nm e A_A é a absorbância das amostras a 535 nm.

A concentração de amostra (em $\mu\text{g/mL}$) que causa uma inibição de 50 % na peroxidação lipídica, definida como IC_{50} , foi calculada a partir dos resultados de % de inibição em função das concentrações de amostras nos ensaios.

4.5.5 *Efeito sobre oxidação de hemoglobina*

O efeito protetor do extrato sobre a oxidação de hemoglobina em eritrócitos expostos ao AAPH foi realizada conforme descrito por Chisté et al. (2014) e Winterbourn (1990), com modificações. Neste método, a oxidação do Fe(II) da hemoglobina é avaliada pela formação de Fe(III), componente da meta-hemoglobina (metHb), após reação com radicais peróxil gerados por AAPH. Na presença de um antioxidante, há menor oxidação de hemoglobina e consequentemente menor formação de metHb.

Misturas reacionais contendo eritrócitos 5 % hematócrito foram pré-incubadas com PBS (controle) e diferentes concentrações de amostra (25 a 250 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C por 30 minutos, sob agitação de 100 rpm (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil). Após pré-incubação, as misturas reacionais foram adicionadas de 50 mM de AAPH (em PBS, pH 7,4) a 37 °C por 4 horas, sob as mesmas condições de agitação. As condições de concentração de eritrócitos e AAPH utilizadas neste ensaio estão de acordo com os melhores parâmetros experimentais obtido por Chisté et al. (2014) para este tipo de análise. O antioxidante comercial ácido ascórbico foi utilizado como composto de referência. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A cada 1 hora de incubação, a formação de meta-hemoglobina foi determinada, retirando-se alíquotas do meio reacional e adicionando água, na proporção de 1:9, para indução de hemólise e, então homogeneizadas suavemente e colocadas em gelo para cessar a reação. Posteriormente, foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga CT-14.000, Cientec, Brasil), com verificação espectrofotométrica do espectro de absorção do sobrenadante entre 500 e 700 nm (Espectrofotômetro DU-800, Beckman Coulter, USA).

Além disto, foram conduzidos ensaios a fim de avaliar a oxidação da hemoglobina extravasada das células (sobrenadante) e da contida no interior celular (*pellet*) durante a incubação, conforme esquema ilustrativo na Figura 26.

Figura 26 – Esquema ilustrativo do procedimento de determinação de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina no ensaio total, no sobrenadante e no *pellet*

Para determinação da hemoglobina total, a hemólise foi induzida com água após incubação de eritrócitos com AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido) e extrato de folhas de oliveira (EFO), com determinação de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina a 577 e 630 nm. Para determinação da hemoglobina extracelular e intracelular, após a incubação, o ensaio foi centrifugado, separando-se sobrenadante e *pellet*. A quantificação de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina foi realizada diretamente no sobrenadante, e após hemólise induzida com água no *pellet*.

Fonte: Própria autoria.

Fontes imagens:

DAVIS, C.P.; SHIEL JR, W.C. **Hemoglobin**. Disponível em: <<http://www.medicinenet.com/hemoglobin/article.htm>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

FINN, W.G.; CAREY, J.L. FLAER-Based Flow Cytometry Analysis of Peripheral Blood for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH). **Warde Medical Laboratory**, v.24, n.1, 2014. Disponível em: <<http://www.wardelab.com/24-1.html>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

PAULA, A.J. et al. Suppression of the hemolytic effect of mesoporous silica nanoparticles after protein corona interaction: independence of the surface microchemical environment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, n.10, p.1807–1814, 2012.

A formação de meta-hemoglobina foi determinada nas frações sobrenadante e *pellet* após as 4 horas de incubação da mesma forma descrita anteriormente. Para isto, alíquotas das misturas reacionais foram retiradas e colocadas em gelo por 5 minutos para cessar a reação. Após centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga CT-14000, Cientec, Brasil), o sobrenadante foi removido para leitura espectrofotométrica. O *pellet* foi cuidadosamente

lavado com PBS duas vezes e adicionado de água para lisar as células e expor o conteúdo de hemoglobina, e então, centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga CT-14000, Cientec, Brasil), para posterior verificação espectrofotométrica do sobrenadante.

As absorbâncias a 630 nm, cujo pico é característico da meta-hemoglobina, e a 577 nm, característico da oxi-hemoglobina (Figura 27), foram utilizados para cálculo das concentrações (em μM) de acordo com eq.(16) e eq.(17), propostas por Winterbourn (1990), baseadas nos coeficientes de extinção molar. A utilização destas equações é válida quando o nível de hemoglobina total se mantém constante com o tempo, o que foi verificado neste estudo, em todos os ensaios.

$$[\text{Oxi-hemoglobina}] (\mu\text{M}) = 66A_{577} - 80A_{630} \quad (16)$$

$$[\text{Meta-hemoglobina}] (\mu\text{M}) = 279A_{630} - 3A_{577} \quad (17)$$

Onde: A_{577} é a absorbância dos ensaios a 577 nm e A_{630} é a absorbância dos ensaios a 630 nm.

Figura 27 – Espectro de absorção da oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina

Fonte: adaptado de DERANGED PHYSIOLOGY. **Methaemoglobin measurement by the blood gas analyser**. Disponível em: <<http://www.derangedphysiology.com/main/core-topics-intensive-care/arterial-blood-gas-interpretation/Chapter%203.0.4/methaemoglobin-measurement-blood-gas-analyser>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

Os resultados de concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina (em μM) do sobrenadante e do *pellet* foram corrigidos, com base no conteúdo de hemoglobina de cada fração, e expressos em função do número de células, baseado em estimativa de que 5% hematócrito equivale aproximadamente a $5,5 \times 10^8$ cél/mL (VALLADA, 1997).

A porcentagem de inibição da oxidação de hemoglobina pelas amostras foi calculada conforme eq.(18).

$$\text{Inibição oxidação hemoglobina (\%)} = [1 - (A_A/A_C)] \times 100 \quad (18)$$

Onde: A_C é a absorbância do ensaio controle a 630 nm e A_A é a absorbância das amostras a 630 nm.

A concentração de amostra (em $\mu\text{g/mL}$) que causa uma inibição de 50 % na oxidação de hemoglobina, definida como IC_{50} , foi calculada a partir dos resultados de % de inibição em função das concentrações de amostras nos ensaios.

4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de até seis experimentos independentes ($n = 6$). Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Teste-t ou Teste de Tukey para comparação de médias, com nível de significância de no mínimo 95 % ($p < 0,05$), através do software estatístico Minitab (Minitab Inc., EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo completo de extração dos compostos das folhas de oliveira, até a obtenção do extrato liofilizado, apresentou um rendimento de $9,9 \pm 0,6$ % em massa (média $\pm$ desvio padrão, $n=6$). Todos os resultados relacionados ao extrato, no presente estudo, estão expressos com relação à massa de extrato seco, após a liofilização.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE *OLEA EUROPAEA L.*

Os efeitos biológicos das folhas de oliveira têm sido atribuídos à presença de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides (GOULAS et al., 2010; JEMAI et al., 2008; HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2014; RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015; ZARE et al., 2012). Estudos demonstram que a oleuropeína está entre os polifenóis mais abundantes em folhas de oliveira, e em muitos casos, é o que se encontra em maior quantidade (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000; BOUAZIZ; SAYADI, 2005; HAYES et al., 2011b; TÓTH et al., 2015; XIE et al., 2015a).

Os resultados relacionados à caracterização do EFO quanto ao poder redutor, que estima o conteúdo de fenólicos totais pela análise de Folin-Ciocalteu, flavonoides totais e oleuropeína estão apresentados na Tabela 3. O perfil cromatográfico do extrato com identificação do pico relativo à oleuropeína, próximo aos 17 minutos de corrida da amostra, está representado na Figura 28. Os resultados obtidos indicam que o processo de extração realizado neste estudo foi eficiente na obtenção de um extrato com poder de redução, provavelmente pela sua composição em fenólicos e flavonoides totais, incluindo o composto fenólico oleuropeína, o que sugere um potencial antioxidante.

Tabela 3 – Poder redutor (Folin-Ciocalteu) e conteúdo de flavonoides totais e oleuropeína do extrato de folhas de oliveira

Poder redutor (Folin-Ciocalteu) (mg AGE/g extrato seco)	Flavonoides totais (mg QE/g extrato seco)	Oleuropeína (mg/g extrato seco)
131,7 $\pm$ 9,4	19,4 $\pm$ 1,3	25,5 $\pm$ 5,2

AGE: equivalentes em ácido gálico; QE: equivalentes em quercetina. Média $\pm$ desvio padrão ($n = 6$)
Fonte: Própria autoria

Figura 28 – Cromatograma obtido por HPLC do extrato de folhas de oliveira processado a 280 nm com indicação de pico correspondente à oleuropeína

Fonte: Própria autoria

Extratos metanólicos de folhas de oliveira obtidos por Abaza et al. (2011) e Ferreira et al. (2007) apresentaram conteúdos de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) de 24,1 e 12,7 mg AGE/g extrato, respectivamente. Já Bilgin e Sahin (2013) obtiveram valores de fenólicos totais variando entre 7 e 62 mg AGE/g amostra seca, em folhas de oliveira de diferentes origens geográficas e obtidos por diferentes métodos de extração. Com relação ao conteúdo de flavonoides totais, Abaza et al. (2011) observaram valor de 21,5 mg equivalente em catequina/g amostra seca em folhas de oliveira, semelhante ao do presente estudo, enquanto que Brahmi et al (2013) ao analisar extratos metanólicos de dois cultivares de folhas de oliveira em diferentes fases de colheita encontraram valores de flavonoides totais entre 1,0 e 3,8 mg equivalente em catequina/g amostra seca.

O conteúdo de oleuropeína em extratos metanólicos de folhas de oliveira, obtido por Tóth et al. (2015) foi 85,2 mg/g amostra seca, enquanto que Brahmi et al. (2013) obtiveram valores entre 0,11 e 0,25 mg/g amostra seca quando avaliaram dois cultivares em diferentes fases de colheita. Em condições ótimas de extração e com metanol 75 % em água, Jemai et al. (2008) obtiveram um extrato de folhas de oliveira com 43,2 mg de oleuropeína/g amostra seca. Extratos etanólicos obtidos por Guinda et al. (2015) a partir de diferentes cultivares apresentaram 44,6 a 87,2 mg de oleuropeína/g amostra seca. Ahmad-Qasem (2013b) e Xie et

al. (2015a) encontraram 74 e 6,53 mg de oleuropeína/g extrato seco, respectivamente, em extratos obtidos com etanol/água.

A composição de um extrato, incluindo seu conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides, varia muito em função de diversos fatores relacionados à planta, como cultivar, localização geográfica e fase de colheita (BILGIN; SAHIN, 2013; BOUAZIZ; SAYADI, 2005; BRAHMI et al., 2013; BRIANTE et al., 2002; GUINDA et al., 2015; KIRITSAKIS et al., 2010; LAGUERRE et al., 2009; MEIRINHOS et al., 2005; RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015; TALHAOUY et al., 2014). Além disto, os processos de extração utilizados na obtenção de extratos, como solvente utilizado, procedimentos de extração, tempo, temperatura, razão de folha/ solvente, entre outros, afetam significativamente a quantidade de compostos fenólicos extraídos (ABAZA et al., 2011; AHMAD-QASEM et al., 2013a, 2013b; BRAHMI et al., 2012; LEE et al., 2009; MYLONAKI et al., 2008; XIE et al., 2015b; XYNOS et al., 2014). Desta forma, este contexto deve ser considerado na comparação dos resultados com dados obtidos por outros estudos na literatura.

A extração dos antioxidantes das folhas de oliveira, conduzida neste estudo, foi realizada com solvente metanol/água, baseado em estudos anteriores, que verificaram maior eficiência deste solvente na extração de compostos fenólicos e flavonoides de plantas em geral, inclusive folhas de oliveira, e maior atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir deste solvente (ABAZA et al., 2011; BRAHMI et al., 2012; KIRITSAKIS et al., 2010; MALIK; BRADFORD, 2008). Este fato tem sido explicado pela maior polaridade do solvente, capaz de extrair compostos fenólicos mais polares, que constituem a maioria dos fenólicos em folhas de oliveira (BRAHMI et al., 2012; KIRITSAKIS et al., 2010). Brahmi et al. (2012) avaliaram extratos de folhas de oliveira obtidos com metanol, clorofórmio, acetato de etila e hexano, e o extrato metanólico apresentou conteúdo de fenólicos totais pelo menos 6 vezes maior e de flavonoides totais pelo menos 3,5 vezes maior que os demais extratos. Kiritsakis et al. (2010) obteve maior quantidade de compostos fenólicos extraídos com metanol/água em comparação com outros solventes menos polares: éter de petróleo, diclorometano e metanol puro.

Neste estudo, previamente à extração com metanol/água, foi realizada a remoção de compostos solúveis em hexano a fim de se obter um extrato com melhor solubilização em meio aquoso, para adequada realização das análises posteriores. Além disto, o pré-tratamento de remoção de lipídios de folhas aumenta a eficiência da transferência de massa interna durante o processo de extração posterior (RODRÍGUEZ-ROJO et al., 2012). Em estudos

anteriores, a extração de folhas de oliveira com hexano resultou em uma fração constituída de ceras, hidrocarbonetos, esqualeno, β -caroteno, triglicerídeos, α -tocoferol, β -sitosterol, alcoóis e diálcoois triterpênicos (GUINDA et al., 2002; TABERA et al., 2004). Alguns estudos mostram que há também extração de compostos fenólicos e flavonoides em hexano, porém em quantidades significativamente inferiores quando comparados com outros solventes (BRAHMI et al., 2012; LEE et al., 2009; XIE et al., 2015b). Da mesma forma, Xie et al. (2015b) observaram menores rendimentos de extração de oleuropeína em hexano, em comparação com outros solventes. Portanto, a partir dos resultados obtidos, observa-se que no presente estudo, com a remoção prévia de compostos solúveis em hexano, foi possível obter um extrato constituído de compostos antioxidantes, incluindo fenólicos e flavonoides, com a necessária solubilidade para realização das análises posteriores em meio fisiológico.

5.2 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Uma vez que várias características de reação e mecanismos específicos podem estar envolvidos em sistemas antioxidantes complexos, nenhum ensaio único reflete com completa precisão todos seus efeitos antioxidantes. Assim, para melhor esclarecer o perfil de capacidade antioxidante do extrato de folhas de oliveira, diferentes metodologias de análise foram utilizadas neste estudo.

5.2.1 Determinação da atividade antioxidante sobre $ABTS^{*+}$ e $DPPH^*$ e do potencial redutor sobre o íon férrico (FRAP)

As análises que utilizam os radicais sintéticos $ABTS^{*+}$ e $DPPH^*$, bem como FRAP avaliam a capacidade antioxidante de uma amostra *in vitro* e são amplamente utilizadas para avaliar diversos compostos e extratos de plantas (EUCH; BOUAJILA; BOUZOUTA, 2015; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; XIE et al., 2015a). Nas análises com $ABTS^{*+}$ e $DPPH^*$ são avaliadas a capacidade da amostra em atuar como sequestrador ou inibidor de radicais livres, enquanto que na análise de FRAP, esta capacidade antioxidante é medida pelo potencial da amostra em reduzir íon férrico a ferroso.

A capacidade do extrato de folhas de oliveira e do padrão trolox em inibir os radicais sintéticos $ABTS^{*+}$ e $DPPH^*$ está apresentada na Figura 29. Os resultados mostram que o extrato de folhas de oliveira apresentou efetiva atividade antioxidante frente a estas análises. É possível verificar que os perfis de inibição do $ABTS^{*+}$ (Figura 29A) e $DPPH^*$ (Figura 29B)

são parecidos, e em ambos os casos, há um aumento na inibição destes radicais com o aumento da concentração de extrato (eixo inferior) ou trolox (eixo superior), o que indica que a atividade antioxidante destas amostras está associada diretamente com suas concentrações. Desta forma, os valores médios podem ser ajustados a equações lineares, que estão apresentadas na Tabela 4, juntamente com os respectivos coeficientes de determinação (r^2).

Figura 29 – Inibição dos radicais (A) $ABTS^{*+}$ e (B) $DPPH^*$ em função da concentração de extrato de folhas de oliveira (EFO) e do padrão trolox

Barras de erro representam desvio padrão (EFO: $n = 6$; trolox: $n = 4$). EFO: triângulos, eixo inferior; Padrão trolox: círculos, eixo superior

Fonte: Própria autoria

Tabela 4 – Parâmetros de relação linear entre a atividade antioxidante sobre os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] e a concentração do extrato de folhas de oliveira e do padrão trolox

	Equação de regressão linear	r ²
ABTS^{•+}		
Extrato folhas de oliveira	$y = 2,8858x + 3,8201$	0,9969
Trolox	$y = 21,911x - 1,1631$	0,9967
DPPH[•]		
Extrato folhas de oliveira	$y = 3,2296x + 5,4004$	0,9983
Trolox	$y = 14,232x + 6,8446$	0,9837

r², coeficiente de determinação; y, porcentagem de inibição do radical; x, concentração de amostra (µg/mL)
 Fonte: Própria autoria

Os resultados de atividade antioxidante do extrato de folhas de oliveira e do padrão trolox, obtidos a partir das análises de ABTS^{•+} e DPPH[•], expressos como valores de IC₅₀ se encontram na Tabela 5. Já a capacidade antioxidante do extrato em equivalente de trolox (TEAC) foi obtida para os ensaios de ABTS^{•+}, DPPH[•] e FRAP (Tabela 5). Como esperado, os valores de IC₅₀ do trolox são significativamente menores que os do extrato ($p < 0,001$), o que indica maior capacidade antioxidante do padrão. Em comparação com o padrão trolox, a capacidade antioxidante da amostra está expressa também como TEAC (Tabela 5). Os valores de TEAC obtidos para o EFO, a partir das diferentes metodologias utilizadas, apresentaram-se significativamente diferentes ($p < 0,01$), o que pode ser explicado pelas diferentes características de reação e mecanismos envolvidos. Os métodos de determinação de atividade antioxidante são extremamente dependentes das condições de reação, dos substratos utilizados e produtos formados. No entanto, estudos já demonstraram alta correlação entre estas diferentes metodologias em diversos tipos de amostra (HAYES et al., 2011b; THAIPONG et al., 2006).

Tabela 5 – Atividades antioxidantes do extrato de folhas de oliveira e do padrão trolox, obtidas nas análises de FRAP, ABTS^{•+} e DPPH[•], expressas como valores de IC₅₀ e TEAC

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)		TEAC (mg TE/g extrato seco)		
	ABTS ^{•+}	DPPH [•]	FRAP	ABTS ^{•+}	DPPH [•]
Extrato folhas de oliveira	16,1 ± 1,2 ^A	13,8 ± 0,8 ^A	281,8 ± 22,8 ^a	148,3 ± 15,1 ^c	215,0 ± 7,6 ^b
Trolox	2,3 ± 0,1 ^B	3,0 ± 0,2 ^B			

TEAC: Capacidade antioxidante equivalente em trolox; TE: equivalente em trolox. Média ± desvio padrão (EFO: n = 6; trolox: n = 4). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,01$). Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,01$).

Fonte: Própria autoria

A atividade antioxidante de extratos de folhas de oliveira frente às análises de FRAP e sobre os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] já foi verificada em estudos anteriores (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000; BOUAZIZ; SAYADI, 2005; HAYES et al., 2011b; KIRITSAKIS et al., 2010; ORAK; ISBILIR; YAGAR, 2012). Hayes et al. (2011b), ao estudar extrato metanólico de folhas de oliveira, obtiveram valor de FRAP de 301 mg TE/g extrato seco, semelhante ao do presente estudo ($281,8 \pm 22,8$ mg TE/g extrato). Além disto, o extrato obtido pelos autores apresentou valores de TEAC de 379,3 mg TE/g extrato seco e IC₅₀ de 34,58 µg/mL, nas análises de ABTS^{•+} e DPPH[•], respectivamente. Por outro lado, valor menor de IC₅₀ (1,57 µg/mL) foi observado por Bouaziz e Sayadi (2005) para sequestro de DPPH[•]. Diferenças observadas nos resultados podem estar relacionadas a diferenças nas metodologias utilizadas e nos procedimentos de extração, que influenciam na quantidade de compostos fenólicos antioxidantes extraídos.

A capacidade antioxidante de folhas de oliveira é atribuída, principalmente, à presença de compostos fenólicos (GOULAS et al., 2010; RAHMANIAN; JAFARI; WANI, 2015; WANG et al., 2011; XIE et al., 2015a). Diversos compostos fenólicos presentes em folhas de oliveira já foram avaliados individualmente e os efeitos antioxidantes foram relacionados à presença de grupos funcionais, quantidade e posição de grupos hidroxila em suas estruturas, o que lhes confere propriedades redox (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000; GOULAS et al., 2010). Além disto, alguns estudos sugerem que os compostos fenólicos possuem efeito sinérgico na capacidade antioxidante quando estão em conjunto, como ocorre em extratos de folhas de oliveira, quando comparados aos seus efeitos individuais (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000; LEE; LEE, 2010; XIE et al., 2015a).

As análises de capacidade antioxidante que utilizam radicais sintéticos, como ABTS^{•+} e DPPH[•], são baseadas estritamente em reações químicas *in vitro*, e não necessariamente representam os efeitos antioxidantes em sistemas biológicos (*in vivo*), no entanto sugerem sua efetividade como antioxidantes em geral (HAYES et al., 2011b). Além disto, há controvérsias a respeito da aplicação destas metodologias, bem como os mecanismos de ação envolvidos (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015). Desta forma, em conjunto com estas análises, foram realizados ensaios com espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio que fazem parte dos processos bioquímicos celulares (O₂^{•-}, HOCl e NO[•]).

5.2.2 Atividade antioxidante sobre $O_2^{\bullet-}$, $HOCl$ e $NO^{\bullet}$

Com relação à atividade antioxidante sobre espécies reativas que participam dos processos biológicos, como ânion superóxido, ácido hipocloroso e óxido nítrico, há poucos estudos realizados com oliveira (folhas ou óleo) e seus fenólicos na literatura (ORAK; ISBILIR; YAGAR, 2012; VISIOLI; BELLOMO; GALLI, 1998; XIE et al., 2015a). Portanto os resultados obtidos no presente estudo são relevantes para o avanço da pesquisa dos efeitos biológicos de folhas de oliveira. O antioxidante ácido ascórbico foi utilizado como composto de referência.

5.2.2.1 Atividade antioxidante sobre $O_2^{\bullet-}$

A capacidade de sequestro de $O_2^{\bullet-}$ foi avaliada por um método não enzimático de geração do radical, através da reação entre PMS e NADH, e monitorado pela redução de NBT a um cromógeno azul. Tanto o extrato como o padrão ácido ascórbico apresentaram capacidade de inibição de $O_2^{\bullet-}$ em diferentes concentrações (Figura 30). É possível observar que em ambos os casos, a inibição do $O_2^{\bullet-}$ ocorre de maneira dependente da concentração da amostra, no qual, à medida que se aumenta a concentração de extrato ou de ácido ascórbico, há uma maior inibição de $O_2^{\bullet-}$. Os valores médios ajustados a equações lineares (Tabela 6) apresentaram coeficientes de determinação (r^2) de 0,9111 e 0,9576 para EFO e ácido ascórbico, respectivamente. Os valores de IC_{50} obtidos para o EFO e o ácido ascórbico foram $52,6 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$ e $59,3 \pm 9,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, sem diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 7). Porém, a partir de $50 \mu\text{g/mL}$, o EFO apresentou maior inibição de $O_2^{\bullet-}$ em comparação com o ácido ascórbico. Na maior concentração estudada ($160 \mu\text{g/mL}$), o extrato de folhas de oliveira e o ácido ascórbico inibiram $O_2^{\bullet-}$ em $76,4 \pm 1,7 \%$ e $69,1 \pm 1,9 \%$, respectivamente.

Figura 30 – Capacidade de inibição de ânion superóxido em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

Barras de erro representam desvio padrão (extrato folhas de oliveira: n = 6; ácido ascórbico: n = 2).

Fonte: Própria autoria

Tabela 6 – Parâmetros de relação linear entre a atividade antioxidante sobre as espécies reativas $O_2^{\bullet-}$, HOCl e $NO^{\bullet}$ e a concentração do extrato de folhas de oliveira e do padrão ácido ascórbico

	Equação de regressão linear	r^2
$O_2^{\bullet-}$		
Extrato folhas de oliveira	$y = 0,8339x + 5,4953$	0,9111
Ácido ascórbico	$y = 0,3167x + 31,024$	0,9576
HOCl		
Extrato folhas de oliveira	$y = 0,0487x + 15,273$	0,9182
Ácido ascórbico	$y = 1,134x + 19,011$	0,9432
$NO^{\bullet}$		
Extrato folhas de oliveira	$y = 0,1411x + 39,451$	0,7564
Ácido ascórbico	$y = 0,2137x + 36,028$	0,9247

$O_2^{\bullet-}$, ânion superóxido; HOCl, ácido hipocloroso; $NO^{\bullet}$, óxido nítrico; r^2 , coeficiente de determinação; y, porcentagem de inibição da espécie reativa; x, concentração de amostra (µg/mL)

Fonte: Própria autoria

Tabela 7 – Valores de IC₅₀ (µg/mL) relativos à atividade antioxidante sobre espécies reativas (ânion superóxido, ácido hipocloroso e óxido nítrico) por extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

	Extrato folhas oliveira	Ácido Ascórbico
Ânion superóxido (O ₂ ^{•-})	52,6 ± 2,1 ^{aB}	59,3 ± 9,2 ^{aA}
Ácido hipocloroso (HOCl)	714,1 ± 31,4 ^{aA}	27,3 ± 1,3 ^{bC}
Óxido nítrico (NO [•])	48,4 ± 6,8 ^{aB}	43,9 ± 8,8 ^{aB}

Média ± desvio padrão (extrato folhas de oliveira: n = 6; ácido ascórbico: n = 3-5). Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa (p < 0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p < 0,05).

Fonte: Própria autoria

Os resultados obtidos demonstram a eficiência do efeito antioxidante do extrato de folhas de oliveira sobre a espécie biológica O₂^{•-}, com efeitos comparáveis aos do padrão ácido ascórbico. Em estudo anterior de atividade sequestradora de ânion superóxido por extratos aquosos de folhas de oliveira de diferentes cultivares, os autores obtiveram valores de IC₅₀ entre 44 e 386 µg/mL (ORAK; ISBILIR; YAGAR, 2012). Devido a diferentes metodologias utilizadas, valores de IC₅₀ para ácido ascórbico na literatura variam de 18 a 700 µg/mL (GEETHA et al., 2004; GOVINDAN; MUTHUKRISHNAN, 2013; LI; ZHANG; MA, 2011; SHUKLA et al., 2012). Já foi relatado que a atividade antioxidante sobre ânion superóxido pode ser devido à ação de grupos hidroxilas livres presentes nos compostos fenólicos (GOVINDAN; MUTHUKRISHNAN, 2013).

O radical ânion superóxido é formado enzimaticamente e/ou quimicamente nos sistemas biológicos, sendo um subproduto da respiração mitocondrial, e em fagócitos, produzido pela enzima NAPH oxidase para combater agentes patogênicos (LÜ et al., 2010). Apesar de não ser tão reativo a biomoléculas, o O₂^{•-} é um importante precursor de outras espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxil e peroxinitrito, que são potentes agentes oxidantes e, quando em quantidades elevadas, podem causar sérios danos celulares (DRÖGE, 2002; HALLIWELL, 1996). Além disto, estas espécies reativas estão relacionadas a várias doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e envelhecimento (FINKEL; HOLBROOK, 2000; VALKO et al., 2007). Desta forma, o equilíbrio destas espécies reativas, principalmente do precursor O₂^{•-}, nos sistemas bioquímicos celulares, é muito importante.

5.2.2.2 Atividade antioxidante sobre HOCl

A capacidade de sequestro de HOCl foi avaliada espectrofotometricamente pela oxidação de TNB a DTNB por HOCl presente no meio. O extrato, em diferentes concentrações, apresentou atividade sequestradora de HOCl, porém em todas as concentrações estudadas o efeito foi menor em comparação com o padrão ácido ascórbico (Figura 31). Na concentração de 1400 $\mu\text{g/mL}$ o EFO e o ácido ascórbico inibiram a formação de HOCl em $59,1 \pm 1,8 \%$ e $96,7 \pm 0,4 \%$, respectivamente. O efeito antioxidante sobre HOCl apresentou-se dependente da quantidade de EFO em todas as concentrações estudadas (100 a 1400 $\mu\text{g/mL}$). O ácido ascórbico também apresentou efeito dependente da concentração até aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$, porém, em concentrações a partir de 150 $\mu\text{g/mL}$, o efeito sobre HOCl permaneceu igual, mesmo com o aumento de até 10 vezes na concentração deste ácido. Considerando as faixas de aumento da inibição de HOCl com a concentração, os valores médios ajustados a equações lineares (Tabela 6) apresentaram coeficientes de determinação (r^2) de 0,9183 e 0,9432 para EFO e ácido ascórbico, respectivamente. O valor de IC_{50} referente ao EFO foi significativamente maior ($p < 0,001$) que do ácido ascórbico, sendo $714,1 \pm 31,4 \mu\text{g/mL}$ e $27,3 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 7). Observa-se desta forma, que em comparação com o padrão, o EFO possui baixa capacidade antioxidante sobre HOCl.

Figura 31 – Capacidade de inibição de ácido hipocloroso em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

Barras de erro representam desvio padrão (extrato folhas de oliveira: $n = 6$; ácido ascórbico: $n = 3$).
Fonte: Própria autoria

Não há registros na literatura de atividade antioxidante de extrato de folhas de oliveira sobre HOCl, porém, os resultados obtidos neste estudo são coerentes com estudos anteriores que verificaram que os principais polifenóis da oliveira, oleuropeína e hidroxitirosol, possuem baixa capacidade de sequestro de HOCl (CZERWINSKA; KISS; NARUSZEWICZ, 2012; RIETJENS; BAST; HAENEN, 2007; VISIOLI; BELLOMO; GALLI, 1998). Com relação ao ácido ascórbico, Hazra, Biswas e Mandal (2008) verificaram IC₅₀ de 236 µg/mL, valor que indica um menor efeito antioxidante do que o observado no presente estudo.

HOCl é um potente oxidante e principal bactericida produzido *in vivo*, em processos fagocitários, pela enzima mieloperoxidase em neutrófilos (OMAR, 2010). Por ser um forte oxidante, é também bastante reativo com vários substratos biológicos, e seu excesso pode causar danos celulares, principalmente em proteínas, incluindo inativação de enzimas (FLORIANO-SÁNCHEZ et al., 2006; OMAR, 2010). Portanto, HOCl pode exercer tanto efeitos benéficos como tóxicos *in vivo* (FLORIANO-SÁNCHEZ et al., 2006).

5.2.2.3 Atividade antioxidante sobre NO[•]

A capacidade de sequestro de NO[•] foi avaliada indiretamente pela formação de íon nitrito a partir da interação de NO[•] com oxigênio. Um extrato antioxidante inibe a formação de nitrito pela competição direta pelo oxigênio na reação com óxido nítrico. O NO[•] foi gerado por decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio em condições fisiológicas. A formação de nitrito durante 3 horas de incubação com diferentes concentrações de EFO está apresentada na Figura 32. Observa-se que, durante o período de incubação, a formação de nitrito foi reduzida na presença de diferentes concentrações de EFO, o que indica atividade sequestradora de óxido nítrico pelo extrato.

Figura 32 – Formação de nitrito por decomposição de nitroprussiato de sódio em função do tempo de incubação na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de extrato de folhas de oliveira

Barras de erro representam desvio padrão (n = 6). Diferença significativa em relação ao ensaio controle: *p < 0,05; **p < 0,01 (Teste t).

Fonte: Própria autoria

As porcentagens de inibição de óxido nítrico pelo extrato de folhas de oliveira e pelo ácido ascórbico, em 2 horas de incubação, estão apresentadas na Figura 33. Em todas as concentrações estudadas (10 a 200 µg/mL), tanto o EFO como o ácido ascórbico apresentaram capacidade de inibição de NO[•]. Na concentração máxima estudada (200 µg/mL) o EFO e o ácido ascórbico inibiram a formação de NO[•] em $62,5 \pm 6,7 \%$ e $80,0 \pm 2,6 \%$, respectivamente. De maneira geral tanto o extrato como o ácido ascórbico apresentaram perfis de inibição semelhantes. Na maioria das concentrações estudadas, um aumento na concentração de extrato não causou aumento significativo na inibição do radical, o que indica que o EFO não apresentou efeito dependente da concentração. A mesma característica ocorreu com o ácido ascórbico, com exceção das concentrações 140 e 200 µg/mL, que causaram aumento na inibição de NO[•] (p < 0,05). Devido a esta baixa dependência da inibição de NO[•] com a concentração, os valores médios ajustados a equações lineares (Tabela 6) apresentaram coeficientes de determinação (r^2) menores que as demais análises, de 0,7564 e 0,9247 para EFO e ácido ascórbico, respectivamente. Os valores de IC₅₀ estimados para EFO e ácido ascórbico foram $48,4 \pm 6,8 \mu\text{g/mL}$ e $43,9 \pm 8,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, sem diferença significativa entre eles (p > 0,05) (Tabela 7).

Figura 33 – Capacidade de inibição de óxido nítrico em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

Barras de erro representam desvio padrão (extrato folhas de oliveira: n = 6; ácido ascórbico: n = 5).
Fonte: Própria autoria

Não há registros na literatura de efeito sequestrador de extratos de folhas de oliveira sobre $\text{NO}^\bullet$, porém existem estudos a nível celular e *in vivo* que verificaram potencial benéfico das folhas de oliveira, como redução da pressão arterial, propriedades anti-inflamatórias e inibição de complicações diabéticas, e os relacionaram aos efeitos sobre a produção de $\text{NO}^\bullet$ e seus níveis celulares (CABRERA-VIQUE et al., 2015; CVJETICANIN et al., 2010; NEKOOEIAN et al., 2011; PARK et al., 2013; VISIOLI et al., 2002; ZASLAVER et al., 2005).

A maioria dos estudos relacionados à atividade antioxidante de oliveira sobre $\text{NO}^\bullet$ normalmente envolvem diretamente os compostos fenólicos de sua composição. Em estudos anteriores foi observado que 5 a 50 μM de oleuropeína inibem aproximadamente 100 % de $\text{NO}^\bullet$ (CZERWINSKA; KISS; NARUSZEWICZ, 2012), e 100 μM de hidroxitirosol inibe 61,3 % de $\text{NO}^\bullet$ (AMMENDOLA et al., 2011). De La Puerta et al. (2001) observaram em seus estudos que os compostos fenólicos oleuropeína, hidroxitirosol e ácido cafeico, presentes em óleo de oliva, nas concentrações de 5 a 75 μM , possuem efeito sequestrador de $\text{NO}^\bullet$, enquanto que o fenólico tirosol não apresentou efeito nas mesmas concentrações. Já Franco et al. (2014) avaliaram óleo de sete variedades de oliveira, a 400 $\mu\text{g/mL}$, e observaram diferentes valores de inibição de $\text{NO}^\bullet$ (24,1 a 42,2 %).

Conforti et al. (2011) avaliaram a atividade sequestradora de óxido nítrico de 18 diferentes espécies de plantas normalmente consumidas no sul da Itália e obtiveram valores de IC_{50} entre 51 e 604 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, os valores de IC_{50} obtidos no presente estudo para folhas de oliveira são comparáveis aos obtidos para as plantas com maior atividade, o que sugere que EFO apresentou boa atividade sequestradora de $\text{NO}^\bullet$. Shukla et al. (2012) observaram um IC_{50} de 66 $\mu\text{g/mL}$ para ácido ascórbico, valor próximo ao obtido no presente estudo.

A produção endógena de óxido nítrico ocorre por enzimas óxido nítrico sintetases. Esta espécie reativa de nitrogênio possui tempo de vida muito curto, da ordem de segundos, e a principal via de metabolismo é sua oxidação gradual para nitrito e nitrato, que possuem maior tempo de estabilidade (BRYAN; GRISHAM, 2007; CHISTÉ et al., 2012; STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992). A produção de $\text{NO}^\bullet$ está envolvida em vários processos fisiológicos *in vivo*, incluindo regulação da pressão sanguínea, neurotransmissão e resposta imunológica, atuando como agente vasodilatador, antimicrobiano e anticancer, entre outros (AMMENDOLA et al., 2011; BRYAN; GRISHAM, 2007; CABRERA-VIQUE et al., 2015). Porém, níveis sustentados de produção de $\text{NO}^\bullet$ possuem efeito citotóxico, podendo causar danos teciduais, e estão associados a diversas condições patológicas, como doenças neurodegenerativas, diabetes, doença arterial coronariana, entre outras (LIU; HOTCHKISS, 1995; YEN; LAI; CHOU, 2001). Os danos devidos ao excesso de $\text{NO}^\bullet$ podem ocorrer pela sua reação direta com biomoléculas ou, principalmente, pela sua combinação com ânion superóxido, formando ânion peroxinitrito, uma espécie altamente reativa e citotóxica (BRYAN; GRISHAM, 2007; GÜLÇİN, 2012; STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992). Desta forma, o efeito sequestrador de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{NO}^\bullet$ por extrato de folhas de oliveira, obtido neste estudo, sugere que a formação do metabólito ONOO^- é também inibida.

A Tabela 7 apresenta um comparativo entre os valores de IC_{50} obtidos para EFO e ácido ascórbico frente à atividade antioxidante sobre as diferentes espécies reativas biológicas estudadas. O EFO apresentou maior efeito sequestrador sobre $\text{NO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ em comparação com HOCl ($p < 0,05$). Já o ácido ascórbico apresentou melhor atividade antioxidante sobre HOCl , seguido de $\text{NO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($p < 0,05$). Estes resultados mostram as variações existentes no potencial antioxidante de diferentes sistemas e compostos, uma vez que diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos.

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia os efeitos antioxidantes de folhas de oliveira sobre estas ERO $O_2^{\bullet-}$, HOCl e $NO^{\bullet}$ de muita importância nos sistemas biológicos. A atividade antioxidante de EFO observada neste estudo sugere que folhas de oliveira têm efeito na prevenção de estresse oxidativo em sistemas vivos. Esta atividade antioxidante pode ser, em parte, responsável por alguns efeitos medicinais das folhas de oliveira, relacionados à geração de radicais livres, como antiviral, antibacteriano, antioxidante e anti-inflamatório, uma vez que produções excessivas de $O_2^{\bullet-}$, HOCl e $NO^{\bullet}$ estão envolvidas em diversas patologias.

5.3 AVALIAÇÃO DE EFEITO PROTETOR SOBRE DANOS OXIDATIVOS INDUZIDOS POR RADICAL LIVRE EM ERITRÓCITOS HUMANOS

O efeito protetor do extrato de folhas de oliveira sobre danos oxidativos em eritrócitos humanos foi avaliado pela indução de tais danos por radicais peroxil ($ROO^{\bullet}$) gerados na decomposição de AAPH.

5.3.1 Efeito sobre hemólise

A hemólise é a quebra das hemácias (glóbulos vermelhos), por rompimento da membrana plasmática, resultando na liberação de hemoglobina (VALLADA, 1997). Os radicais peroxil gerados na decomposição de AAPH atacam os componentes das membranas dos eritrócitos, como proteínas e lipídios, causando alterações na estrutura e função da membrana, podendo causar hemólise (REDDY et al., 2007; ZOU; AGAR; JONES, 2001).

A incubação com AAPH (5 mM) induziu a hemólise dos eritrócitos de maneira dependente do tempo de exposição, provocando até $40,3 \pm 7,1$ % de hemólise em 6 horas de incubação (Figura 34). A hemólise dos eritrócitos induzida por AAPH foi inibida na presença de extrato (Figura 34A) e ácido ascórbico (Figura 34B) durante o tempo de incubação. Quando utilizados na concentração de 5 μ g/mL, o ácido ascórbico e o extrato não reduziram significativamente a hemólise a partir de 4 e 5 horas de incubação, respectivamente ($p > 0,05$). A incubação de eritrócitos com EFO na ausência de AAPH não causou hemólise durante as 6 horas de reação, o que indica que o extrato não causa dano hemolítico em eritrócitos (resultado não apresentado).

Figura 34 – Hemólise induzida por AAPH (5 mM) em eritrócitos humanos (1 % hematócrito) durante o período de incubação na presença de (A) extrato de folhas de oliveira (EFO) e (B) ácido ascórbico (AA)

Barras de erro representam desvio padrão (EFO: n = 5; AA: n = 3). Diferença significativa em relação ao ensaio AAPH: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste t).

Fonte: Própria autoria

Considerando 4 horas de incubação, a inibição da hemólise induzida por AAPH pelo extrato e ácido ascórbico em diferentes concentrações está apresentada na Figura 35. É possível observar que tanto o extrato como o ácido ascórbico reduziram a hemólise dos eritrócitos, de maneira dependente da concentração até 15 µg/mL. Considerando as faixas de aumento da inibição de hemólise com a concentração, os valores médios ajustados a equações lineares (Tabela 8) apresentaram coeficientes de determinação (r^2) de 0,9600 e 0,9434 para EFO e ácido ascórbico, respectivamente. Os valores de IC_{50} obtidos para EFO e ácido

ascórbico foram $7,8 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ e $5,7 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, sem diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que, nas condições utilizadas neste estudo, EFO em baixas concentrações possuem relevante efeito protetor sobre hemólise induzida por AAPH em eritrócitos humanos, similarmente ao padrão ácido ascórbico, o que indica forte potencial antioxidante do extrato nos sistemas biológicos.

Figura 35 – Inibição de hemólise induzida por AAPH (5 mM) em eritrócitos humanos (1 % hematócrito), em 4 horas de reação, em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

Barras de erro representam desvio padrão (extrato folhas de oliveira: $n = 5$; ácido ascórbico: $n = 3$).
Fonte: Própria autoria

Tabela 8 – Parâmetros de relação linear entre a inibição de hemólise em eritrócitos humanos em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

	Equação de regressão linear	r^2
Extrato folhas de oliveira	$y = 4,6057x + 15,518$	0,9600
Ácido ascórbico	$y = 5,5494x + 11,738$	0,9434

r^2 , coeficiente de determinação; y , porcentagem de inibição do respectivo ensaio; x , concentração de amostra ($\mu\text{g/mL}$)
Fonte: Própria autoria

Na avaliação de hemólise dos eritrócitos por microscopia óptica (Figura 36), utilizando a mesma concentração e volume de células, foi possível observar redução na densidade de hemácias quando incubadas na presença de 10 mM de AAPH (Figura 36B). O extrato de folhas de oliveira (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) protegeu as hemácias contra hemólise induzida por AAPH, conforme verificado pela maior densidade de hemácias visualizadas (Figura 36C e D), quando comparadas à incubação apenas com AAPH (Figura 36B). Estas observações estão de acordo com os resultados do estudo de hemólise, obtidos por espectrofotometria.

Figura 36 – Avaliação por microscopia óptica de hemólise em eritrócitos humanos (1 % hematócrito) após 4 horas de incubação (A) na ausência de AAPH (Controle); (B) na presença de AAPH (10 mM); (C) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (25 $\mu\text{g/mL}$); (D) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (50 $\mu\text{g/mL}$)

Ampliação 400×
Fonte: Própria autoria

A visualização por MEV dos eritrócitos após incubação na presença ou ausência de AAPH e extrato de folhas de oliveira está apresentada na Figura 37. Na ausência de AAPH, as

hemácias apresentavam-se em sua forma bicôncava normal, e visualmente íntegras (Figura 37A). Já após incubação na presença de 10 mM de AAPH (Figura 37B) a forma e tamanho das hemácias sofreram alterações, com várias protuberâncias em suas superfícies (equinócitos ou hemácias crenadas) (VALLADA, 1997), devido à oxidação por radicais peroxil. Estas alterações morfológicas, provocadas por AAPH, foram inibidas na presença de extrato de folhas de oliveira (50 µg/mL) (Figura 37D), uma vez que as hemácias mantiveram sua forma bicôncava normal, e na presença de 25 µg/mL de EFO, apenas poucas células apresentaram ligeira alteração conformacional (Figura 37C). Os processos oxidativos, como peroxidação dos lipídios da membrana celular, e oxidação das proteínas da membrana, podem causar formação de bolhas e protuberâncias, que normalmente ocasionam assimetria da membrana e alterações estruturais nos eritrócitos (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; DE OLIVEIRA; SALDANHA, 2010).

Figura 37 – Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de hemólise em eritrócitos humanos (1 % hematócrito) após 4 horas de incubação (A) na ausência de AAPH (Controle); (B) na presença de AAPH (10 mM); (C) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (25 µg/mL); (D) na presença de AAPH (10 mM) e EFO (50 µg/mL)

Ampliação 5000×
Fonte: Própria autoria

Há poucos estudos na literatura de efeito antioxidante de folhas de oliveira em nível celular. Ferreira et al. (2007) observaram efeito protetor de extratos de folhas de oliveira sobre hemólise induzida por AAPH em eritrócitos de carneiro. Os autores relacionaram a inibição de hemólise à atividade antioxidante pelo ensaio com DPPH, e sugeriram que os mecanismos de ação em ambos os casos esteja relacionado ao conteúdo de fenólicos totais. Estudos anteriores observaram efeitos protetores dos principais compostos fenólicos presentes na oliveira e seus metabólitos, sobre hemólise induzida e alterações na membrana de eritrócitos humanos (GONÇALVES, 2013; MANNA et al., 1999; PAIVA-MARTINS et al., 2009a, 2010, 2013, 2015; TAGLIAFIERRO et al., 2015).

5.3.2 Efeito sobre peroxidação lipídica

Eritrócitos são bastante susceptíveis à peroxidação lipídica devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados presentes em suas membranas (CLEMENS; WALLER, 1987; MURADOR; DEFFUNE, 2007; PANDEY; RIZVI, 2011). Este processo de peroxidação lipídica pode causar danos na membrana celular eritrocitária, e tem sido relacionado a alterações morfológicas e funcionais, bem como alteração da permeabilidade e perda de integridade da membrana, podendo levar a disfunção do eritrócito (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; PANDEY; RIZVI, 2011; TESORIERI et al., 2002). Neste estudo, a peroxidação lipídica induzida por AAPH, bem como o efeito protetor do extrato, foi avaliado pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, dentre eles o malondialdeído, um produto carbonílico da peroxidação lipídica.

Os resultados de TBARS obtidos nos ensaios com eritrócitos incubados na ausência ou presença de AAPH (50 mM) e de diferentes concentrações de EFO ou de ácido ascórbico estão apresentadas na Figura 38A e 38B, respectivamente. Na presença de AAPH a peroxidação lipídica aumentou significativamente em relação ao controle, de maneira dependente do tempo de incubação, atingindo um teor máximo de TBARS em 3 horas de incubação ($1,47 \pm 0,15 \mu\text{M}$), permanecendo constante até 4 horas, perfil semelhante ao observado por Zou, Agar e Jones (2001). Na presença de EFO (25 a 250 $\mu\text{g/mL}$) houve redução na peroxidação lipídica induzida por AAPH, a partir de 2 horas de incubação. Em 4 horas de incubação, a menor concentração de ácido ascórbico (25 $\mu\text{g/mL}$) não inibiu a peroxidação lipídica, enquanto que o EFO apresentou efeito protetor em todas as concentrações. A Incubação de eritrócitos com o extrato de folhas de oliveira na ausência de

AAPH apresentou níveis de peroxidação lipídica similares ao controle, o que indica que o extrato, nas condições do estudo, não provoca peroxidação lipídica nos eritrócitos (resultado não apresentado).

Figura 38 – Peroxidação lipídica, representada pelo conteúdo de TBARS (μM), em eritrócitos (5 % hematócrito) durante 4 horas de exposição ao AAPH (50 mM), em função da concentração de extrato de folhas de oliveira (EFO) e ácido ascórbico (AA)

Barras de erro representam desvio padrão (EFO: $n = 6$; AA: $n = 5$). Diferença significativa em relação ao ensaio AAPH: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste t).

Fonte: Própria autoria

A inibição na formação de TBARS nos eritrócitos por EFO e ácido ascórbico em diferentes concentrações, após 3 horas de incubação com AAPH (50 mM) está apresentada na Figura 39. O extrato inibiu a peroxidação lipídica nos eritrócitos de maneira dependente da concentração. O padrão ácido ascórbico também inibiu a formação de TBARS e, a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$, esta inibição foi dependente da concentração, com um aumento significativo na presença de 250 $\mu\text{g/mL}$. Até 150 $\mu\text{g/mL}$ o ácido ascórbico foi menos eficiente que o EFO. Os valores médios de inibição ajustados a equações lineares (Tabela 9) apresentaram coeficientes de determinação (r^2) de 0,8573 e 0,9799 para EFO e ácido ascórbico, respectivamente. O EFO apresentou IC_{50} significativamente menor que o ácido ascórbico, com valores de $38,0 \pm 11,7$ $\mu\text{g/mL}$ e $137,2 \pm 24,1$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente ($p < 0,01$). Para cálculo do IC_{50} do ácido ascórbico foram utilizadas também concentrações entre 150 e 250 $\mu\text{g/mL}$ nos ensaios (resultados não apresentados). Os resultados sugerem que, nas condições utilizadas neste estudo, o extrato de folhas de oliveira possui maior efeito inibidor de peroxidação lipídica induzida por AAPH em eritrócitos humanos que o ácido ascórbico, o que indica forte potencial antioxidante do extrato na prevenção de danos oxidativos celulares.

Figura 39 – Porcentagem de inibição de peroxidação lipídica (expressa em TBARS) induzida por AAPH (50 mM) em eritrócitos (5 % hematócrito), em 3 horas de reação, em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico.

Barras de erro representam desvio padrão ($n = 5$)

Fonte: Própria autoria

Tabela 9 – Parâmetros de relação linear entre a inibição de peroxidação lipídica em eritrócitos humanos em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

	Equação de regressão linear	r²
Extrato folhas de oliveira	$y = 0,1655x + 42,576$	0,8573
Ácido ascórbico	$y = 0,3823x - 3,7264$	0,9799

r², coeficiente de determinação; y, porcentagem de inibição do respectivo ensaio; x, concentração de amostra (µg/mL)
 Fonte: Própria autoria

A peroxidação dos lipídios das membranas, em conjunto com danos oxidativos às proteínas das membranas tem sido relacionadas a alterações estruturais e morfológicas nos eritrócitos (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; ZOU; AGAR; JONES, 2001). Portanto, os resultados obtidos nas análises bioquímicas de peroxidação lipídica confirmam as observações realizadas na análise por MEV.

Manna et al. (1999), verificaram que o hidroxitirosol, importante composto fenólico da oliveira, previne peroxidação lipídica e hemólise, induzidas por H₂O₂, em eritrócitos humanos. Um estudo *in vivo* observou redução no valor de TBARS em fígado, coração, rins e aorta de ratos Wistar, após administração oral de extratos de folhas de oliveira ricos em compostos fenólicos, como oleuropeína e hidroxitirosol (JEMAI et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos nos processos oxidativos induzidos por radicais livres nas células vermelhas do sangue não estão totalmente esclarecidos. Estudos anteriores sugerem que a ocorrência de hemólise, quando eritrócitos são expostos a AAPH, é devida a ação dos radicais peroxil sobre proteínas da membrana celular e na indução da peroxidação lipídica da membrana (SATO et al., 1995; SIMÃO et al., 2006; ZOU; AGAR; JONES, 2001). No entanto, alguns autores verificaram que, antes da ocorrência de hemólise induzida por AAPH, não há peroxidação lipídica e/ou oxidação de hemoglobina significativa em eritrócitos, e sugerem que o AAPH não possui habilidade em entrar nos eritrócitos e acessar a hemoglobina e os ácidos graxos poli-insaturados localizados na fase citosólica da membrana (CELEDÓN et al., 2001a; 2001b).

Outros estudos demonstraram que o ácido ascórbico é um potente inibidor da ação de radicais peroxil e reduz significativamente a hemólise e outros danos oxidativos em eritrócitos (NIKI, 1991; RAVAL et al., 2013; SATO et al., 1995). No entanto, o extrato de folhas de oliveira apresentou maior efeito protetor sobre a peroxidação lipídica que o ácido ascórbico. Desta forma, os resultados do presente estudo demonstram que o EFO atuou eficientemente na inibição de danos oxidativos induzidos por radicais peroxil em eritrócitos humanos.

5.3.3 Efeito sobre oxidação de hemoglobina

A hemoglobina é a principal proteína presente nas células vermelhas do sangue (DE OLIVEIRA; SALDANHA, 2010; PANDEY; RIZVI, 2011), e em condições de estresse oxidativo, há um aumento na oxidação de hemoglobina, e conseqüentemente nos níveis de metHb, prejudicando as funções celulares das hemácias (ARBOS et al., 2008).

A Figura 40 apresenta as concentrações de metHb ao longo do tempo de incubação dos eritrócitos na ausência ou presença de AAPH (50 mM) e sob diferentes concentrações de extrato ou ácido ascórbico. É possível observar que na presença de AAPH ocorreu oxidação gradual de hemoglobina, com formação de metHb, de maneira dependente do tempo de incubação, atingindo a concentração total de metHb de $718,1 \pm 66,6 \mu\text{M}$ em 4 horas de incubação. A formação de metHb, induzida por AAPH nos eritrócitos, foi inibida na presença de diferentes concentrações de extrato (Figura 40A) e ácido ascórbico (Figura 40B) durante o tempo de incubação. Quando utilizados na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$, o ácido ascórbico e EFO não reduziram significativamente a hemólise a partir de 3 e 4 horas de incubação, respectivamente, comparado ao ensaio na presença de AAPH ($p > 0,05$). A incubação de eritrócitos com EFO na ausência de AAPH não apresentou formação de metHb, o que indica que o extrato não provoca oxidação de hemoglobina nos eritrócitos (resultado não apresentado).

A inibição na formação de metHb nos eritrócitos presentes nos ensaios, induzida por AAPH, em 4 horas de reação pelo extrato e ácido ascórbico, em diferentes concentrações, está apresentada na Figura 41. É possível observar que tanto o EFO como o antioxidante ácido ascórbico (50 a $250 \mu\text{g/mL}$) inibiram a oxidação de hemoglobina a meta-hemoglobina de maneira dependente da concentração. Na concentração máxima utilizada ($250 \mu\text{g/mL}$), o extrato e o ácido ascórbico inibiram a formação de metHb em $66,6 \pm 7,5 \%$ e $85,4 \pm 13,3 \%$, respectivamente. Os valores médios ajustados a equações lineares (Tabela 10) apresentaram coeficientes de determinação (r^2) de $0,9793$ e $0,9608$ para EFO e ácido ascórbico, respectivamente. Os valores de IC_{50} obtidos para o extrato e o ácido ascórbico foram $186,3 \pm 29,7 \mu\text{g/mL}$ e $157,0 \pm 34,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, sem diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que, nas condições deste estudo, EFO possui o mesmo efeito protetor que o padrão ácido ascórbico na oxidação de hemoglobina induzida por AAPH em eritrócitos humanos, o que mostra importante potencial antioxidante do extrato na prevenção de processos oxidativos celulares. Os resultados obtidos são coerentes com estudos

anteriores de Gonçalves (2013) e Paiva-Martins et al. (2013), que verificaram que metabólitos do hidroxitirosol, composto fenólico presente em oliveira, previnem a oxidação de hemoglobina a meta-hemoglobina em eritrócitos humanos, após indução por AAPH.

Figura 40 – Formação de meta-hemoglobina (μM) induzida por AAPH (50 mM) em eritrócitos humanos (5 % hematócrito) em função do tempo de reação, na presença de extrato de folhas de oliveira (EFO) e ácido ascórbico (AA)

Barras de erro representam desvio padrão (EFO: $n = 6$; AA: $n = 3$). Diferença significativa em relação ao ensaio AAPH: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste t).

Fonte: Própria autoria

Figura 41 – Porcentagem de inibição de oxidação de hemoglobina a meta-hemoglobina induzida por AAPH (50 mM) em eritrócitos humanos (5 % hematócrito), em 4 horas de reação, em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

Barras de erro representam desvio padrão (extrato folhas de oliveira: n = 6; ácido ascórbico: n = 3).
Fonte: Própria autoria

Tabela 10 – Parâmetros de relação linear entre a inibição de formação de meta-hemoglobina em eritrócitos humanos em função da concentração de extrato de folhas de oliveira e ácido ascórbico

	Equação de regressão linear	r ²
Extrato folhas de oliveira	$y = 0,3007x - 6,4954$	0,9793
Ácido ascórbico	$y = 0,431x - 19,999$	0,9608

r², coeficiente de determinação; y, porcentagem de inibição do respectivo ensaio; x, concentração de amostra (µg/mL)
Fonte: Própria autoria

Durante a incubação dos eritrócitos com AAPH (50 mM) houve ocorrência de hemólise. Desta forma, para melhor compreensão da ação antioxidante do extrato sobre a oxidação de hemoglobina, foram também realizadas análises separadamente no sobrenadante, para avaliar a oxidação da hemoglobina que extravasou do meio celular durante o ensaio; e no *pellet*, para verificar a hemoglobina intracelular. Na Tabela 11 estão os resultados de concentração de meta-hemoglobina e oxi-hemoglobina no ensaio total (sobrenadante + *pellet*), somente no sobrenadante e somente no *pellet* após 4 horas de incubação na ausência ou presença de AAPH (50 mM) e diferentes concentrações de EFO. Não houve diferença significativa nos valores das concentrações totais de metHb ou de oxiHb e aqueles obtidos do somatório das concentrações do sobrenadante e *pellet* para cada forma da hemoglobina ($p <$

0,05). Estes resultados mostram a repetibilidade dos ensaios da oxidação de hemoglobina, sejam realizados na totalidade ou separadamente no sobrenadante e *pellet*. Para melhor visualização, os resultados estão representados na Figura 42.

Tabela 11 – Formação de meta-hemoglobina e oxi-hemoglobina nas hemácias totais, hemácias lisadas (sobrenadante) e nas hemácias íntegras (*pellet*) após 4 horas de incubação dos eritrócitos (5 % hematócrito) na ausência ou presença de AAPH (50 mM)

Condição experimental	Concentração total		Sobrenadante		<i>Pellet</i>	
	MetHb (μM)	OxiHb (μM)	MetHb (μM)	OxiHb (μM)	MetHb (μM)	OxiHb (μM)
Controle	19,6 ± 5,1**	956,4 ± 40,6**	3,3 ± 1,7**	11,9 ± 3,2*	28,8 ± 17,2	863,1 ± 36,7**
AAPH	718,1 ± 66,6	171,1 ± 38,3	812,6 ± 94,7	189,1 ± 32,8	25,1 ± 4,6	7,4 ± 2,2
AAPH +50 μg/mL EFO	683,0 ± 70,1	250,3 ± 84,3	729,5 ± 47,5	281,4 ± 41,6*	20,5 ± 7,5	7,5 ± 1,9
AAPH +100 μg/mL EFO	543,7 ± 117,1*	447,6 ± 82,2**	561,4 ± 78,7**	371,7 ± 91,7**	16,1 ± 5,5*	13,2 ± 3,6
AAPH +150 μg/mL EFO	406,0 ± 93,2**	612,4 ± 45,9**	362,5 ± 17,6**	387,8 ± 27,0**	32,4 ± 18,8	172,9 ± 52,9*
AAPH +250 μg/mL EFO	207,8 ± 33,5**	712,0 ± 109,8**	18,1 ± 6,1**	4,1 ± 2,4*	127,4 ± 31,4**	635,9 ± 63,9**

MetHb, meta-hemoglobina; OxiHb, oxi-hemoglobina; EFO, extrato de folhas de oliveira. Diferença significativa em relação ao ensaio AAPH, na mesma coluna: * p < 0,05; ** p < 0,01 (Teste t).

Fonte: Própria autoria

Na incubação controle, ou seja, na ausência de AAPH e EFO, praticamente toda a hemoglobina manteve-se dentro das células e na forma de oxi-hemoglobina, o que indica que não houve hemólise, e também não ocorreu oxidação significativa de oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina (Figura 42C). Na presença de AAPH, praticamente toda a concentração de hemoglobina presente foi detectada no exterior das células, ou seja, no sobrenadante, uma vez que a incubação com AAPH provocou hemólise (Figura 42B). Além disto, neste caso, aproximadamente 80 % da hemoglobina estava na forma de metHb, provavelmente devido à existência de radicais peróxil gerados na decomposição de AAPH. Já na presença de EFO, observou-se menores concentrações de metHb e de hemoglobina total extravasada das células, dependente da concentração de extrato, o que indica que o EFO atuou tanto na inibição da oxidação da hemoglobina a meta-hemoglobina como na inibição da hemólise (Figura 42B).

A análise dos eritrócitos íntegros (*pellet*), ou seja, não hemolisados, permite detectar efeito protetor do extrato sobre danos pré-hemolíticos, anteriores à ocorrência de hemólise. A presença de 150 e 250 μg/mL de EFO inibe a hemólise induzida por AAPH em relação às outras concentrações de extrato (Figura 42C), pois maior concentração de hemoglobina no *pellet* representa um número maior de células íntegras.

Figura 42 – Concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina (A) total (sobrenadante + *pellet*); (B) somente sobrenadante e (C) somente *pellet* após 4 horas de incubação dos eritrócitos (5 % hematócrito) na ausência ou presença de AAPH (50 mM)

Barras de erro representam desvio padrão (n = 5).
Fonte: Própria autoria

Para avaliar a oxidação de hemoglobina pré-hemólise, os resultados da Tabela 11 foram corrigidos, com base no conteúdo de hemoglobina, e expressos em função do número de células, considerando que 5% hematócrito equivale aproximadamente a $5,5 \times 10^8$ cél/mL (VALLADA, 1997). Desta forma foi possível visualizar as quantidades e proporções de metHb e oxiHb em $\mu\text{mol}/10^{10}$ células (Figura 43). No ensaio controle, observa-se a prevalência de oxi-hemoglobina em relação à forma oxidada meta-hemoglobina, seja no sobrenadante ou no *pellet*. Por outro lado, a presença de AAPH induz a oxidação da hemoglobina tanto no sobrenadante como no *pellet*, demonstrando a ação deste oxidante sobre a oxidação da oxi-hemoglobina-(FeII) a meta-hemoglobina-(FeIII) mesmo no interior celular.

Figura 43 – Concentração de oxi-hemoglobina e meta-hemoglobina, em $\mu\text{mol}/10^{10}$ células, no (A) sobrenadante e (B) *pellet* após 4 horas de incubação dos eritrócitos (5 % hematócrito) na ausência ou presença de AAPH (50 mM)

Barras de erro representam desvio padrão (n = 5). Diferença significativa em relação ao ensaio AAPH: * p < 0,05; ** p < 0,01 (Teste t).

Fonte: Própria autoria

Os resultados apresentados na Figura 43B mostram que houve oxidação pré-hemolítica de hemoglobina. Ao contrário do presente estudo, Simão et al. (2006) não observou formação de metHb nas células íntegras após 4 horas de incubação com AAPH (5 mM), e sugeriu que a oxidação de hemoglobina não parece fazer parte dos danos pré-hemolíticos em eritrócitos. Esta diferença de resultados pode estar relacionada com a menor concentração de AAPH utilizada (5 mM) em comparação com o presente estudo (50 mM). Os resultados mostram que o EFO (100 e 150 µg/mL) protegeu a oxidação de hemoglobina no meio extracelular (sobrenadante), e também aquela no interior do eritrócito (Figura 43A e 43B). Porém, o extrato na concentração de 250 µg/mL, não protegeu os efeitos oxidativos do AAPH sobre a hemoglobina no meio extracelular (Figura 43A); mas, no entanto, o extrato nesta concentração evitou a oxidação da proteína dentro da célula (Figura 43B).

Apesar da concentração de AAPH ser a mesma em todos os ensaios (50 mM), a relação entre AAPH e quantidade de hemoglobina no sobrenadante varia em função da concentração de extrato, pois a porcentagem de hemólise é dependente de EFO. A concentração de hemoglobina é aproximadamente 1000 µM no sobrenadante dos ensaios com AAPH na ausência de extrato. Entretanto, quando na presença de 50, 100, 150 e 250 µg/mL de EFO a concentração de hemoglobina é 984, 988, 747 e 21 µM, respectivamente. Desta forma, a razão entre as concentrações de AAPH:hemoglobina do sobrenadante nos ensaios foram 0,05:1, 0,05:1, 0,05:1, 0,07:1 e 2,3:1, na presença de somente AAPH ou AAPH mais EFO nas concentrações de 50, 100, 150 e 250 µg/mL, respectivamente. Portanto, observa-se que para todos os ensaios, exceto para aquele contendo 250 µg/mL de EFO, a relação foi de aproximadamente 0,05 de AAPH para cada unidade de hemoglobina. Na presença de 250 µg/mL de extrato, a relação AAPH:hemoglobina foi de 2,3:1, ou seja, a hemoglobina do sobrenadante estava exposta à maior concentração de AAPH, proporcionalmente, o que pode explicar o fato do extrato nesta concentração não ter protegido a oxidação de oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina (Figura 43A).

Em estudos anteriores com modelos de membranas fosfolipídicas, alguns autores avaliaram a interação de compostos fenólicos nas membranas, e observaram que a oleuropeína pode atravessar a membrana e atuar como antioxidante no interior da mesma, ou seja, no meio intracelular, enquanto que o hidroxitirosol atuaria próximo à superfície das membranas (SAIJA et al., 1998; SAIJA; UCCELLA, 2001). Ao contrário, em estudos mais recentes, outros autores propuseram uma localização superficial da oleuropeína nas

membranas de bicamada fosfolipídica, onde este composto teria um papel efetivo como antioxidante (PAIVA-MARTINS; GORDON; GAMEIRO, 2003; CATURLA et al., 2005).

Com relação ao processo de indução da formação de meta-hemoglobina no interior celular pelo AAPH e a proteção deste efeito pelo extrato, cabe ressaltar que de alguma forma, os radicais peroxil provenientes do AAPH acessaram a hemoglobina intracelular ou provocaram alterações que atingiram a hemoglobina intracelular, causando a oxidação do Fe(II) dessa proteína. Assim, os antioxidantes presentes no extrato de folhas de oliveira neutralizaram os efeitos deletérios do AAPH sobre o eritrócito. Porém, estudos sugerem que os radicais peroxil gerados na decomposição de AAPH não são capazes de promover oxidação significativa na hemoglobina intracelular devido a sua baixa habilidade de penetração nos eritrócitos (CELEDÓN et al., 2001a; 2001b). Outra possível explicação pode estar relacionada ao processo de auto-oxidação da hemoglobina a meta-hemoglobina, que ocorre naturalmente nos eritrócitos (WINTERBOURN, 1990), sendo este processo exacerbado pela presença do oxidante.

Neste estudo, para análise de oxidação de hemoglobina e peroxidação lipídica foram usadas concentrações 10 vezes maiores de AAPH (50 mM) em relação ao ensaio de hemólise (5 mM), para ser possível quantificar espectrofotometricamente os danos oxidativos. Portanto, menores concentrações de AAPH são capazes de induzir hemólise em eritrócitos, mas não foram suficientes para avaliar a indução de peroxidação lipídica e oxidação de hemoglobina.

Não há registros na literatura de efeito protetor de extratos de folhas de oliveira sobre os diversos danos oxidativos induzidos em eritrócitos humanos, avaliados no presente estudo. Portanto, os resultados obtidos representam uma importante contribuição para a avaliação do potencial antioxidante deste produto natural, bem como para o melhor entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nos sistemas biológicos. Além disto, os resultados obtidos podem colaborar para uma maior compreensão de estudos realizados *in vivo* com extratos de folhas de oliveira.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam que extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) são importantes fontes de antioxidantes naturais, como compostos fenólicos e flavonoides, e possuem efetiva atividade antioxidante frente a diferentes metodologias utilizadas. Uma vez que inibem a ação de espécies reativas que participam dos processos bioquímicos celulares ($O_2^{\bullet-}$, HOCl e $NO^{\bullet}$), e protegem eritrócitos humanos contra danos oxidativos (hemólise, alterações morfológicas, peroxidação lipídica e oxidação de hemoglobina), extratos de folhas de oliveira possuem efetiva atividade antioxidante também em sistemas biológicos, sugerindo que sua ingestão pode estar relacionada com a prevenção de estresse oxidativo *in vivo*, com consequentes benefícios à saúde. Além disto, extratos de folhas de oliveira têm potencial para ser utilizado como antioxidante natural na preservação de produtos alimentícios, medicamentos e cosméticos, nos quais reações em cadeia mediadas por radicais livres resultam em oxidação lipídica e subsequente deterioração.

No entanto, os compostos responsáveis pelos efeitos antioxidantes de extratos de folhas de oliveira ainda não estão totalmente esclarecidos. Portanto, são necessários estudos complementares para isolamento e identificação dos compostos ativos nos extratos e sua eficiência. Além disto, mais estudos *in vivo* devem ser realizados para confirmação dos resultados obtidos até o momento.

REFERÊNCIAS

- AARDT, M.V. et al. Effect of antioxidant (α -tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.872-880, 2005.
- ABAZA, L. et al. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. **Grasas y Aceites**, v.62, n.1, p.96-104, 2011.
- AHMAD-QASEM, M.H. et al. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. **Food Research International**, v.50, p.189-196, 2013a.
- AHMAD-QASEM, M.H. et al. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.17, p.120-129, 2013b.
- AHN, D.U.; NAM, K.C. Effects of ascorbic acid and antioxidants on color, lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef. **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, p.149-154, 2004.
- ALTINYAY, Ç.; ALTUN, M.L. HPLC analysis of oleuropein in *Olea europaea* L. **Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University**, v.35, n.1, p.1-11, 2006.
- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.7915-7922, 1993.
- AMMENDOLA, S. et al. Antioxidant properties of hydroxytyrosyl acetate compared with hydroxytyrosol and their protective capacity against oxidative stress in human neuroblastoma cells. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.70, p.929-937, 2011.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- ANSARI, F.A.; ALI, S.N.; MAHMOOD, R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v.29, p.1878-1886, 2015.
- ARBOS, K.A. et al. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v.28, p.457-463, 2008.
- ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, n.7, 671-683, 1994.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v.78, n.2, p.547-581, 1998.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v.68, p.457-462, 2000.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BERTONCINI, E.I. Cultivo de oliveiras no estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia**, Apta Regional, v.9, n.2, 2012. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2012/julho-dezembro-2/1214-cultivo-de-oliveiras-no-estado-de-sao-paulo/file.html>>. Acesso em: 07 nov. 2015.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BIANCO, A.; RAMUNNO, A. The chemistry of *Olea europaea*. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.33, p.859-903, 2006.

BILGIN, M.; SAHIN, S. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.44, p.8-12, 2013.

BOTSOGLU, E. et al. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.121, p.17-22, 2010.

BOTSOGLU, E.N. et al. Olive leaves (*Olea europaea* L.) versus α -tocopheryl acetate as dietary supplements for enhancing the oxidative stability of eggs enriched with very-long-chain n-3 fatty acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.2053-2060, 2013.

BOUAZIZ, M.; SAYADI, S. Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.107, p.497-504, 2005.

BRAHMI, F. et al. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**, v.38, p.146-152, 2012.

BRAHMI, F. et al. Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, p.169-178, 2014.

BRAHMI, F. et al. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.256-264, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRIANTE, R. et al. Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. **Journal of Biotechnology**, v.93, p.109–119, 2002.

BRYAN, N.S.; GRISHAM, M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.645–657, 2007.

CABRERA-VIQUE, C. et al. Efecto hipotensor de un extracto de componentes bioactivos de hojas de olivo: estudio clínico preliminar. **Nutrición Hospitalaria**, v.32, n.1, p.242–249, 2015.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, v.93, p.223–226, 2005.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15–25, 2013.

CELEDÓN, G. et al. Contribution of haemoglobin and membrane constituents modification to human erythrocyte damage promoted by peroxy radicals of different charge and hydrophobicity. **Free Radical Research**, v.34, p.17–31, 2001a.

CELEDÓN, G. et al. Free radical-induced protein degradation of erythrocyte membrane is influenced by the localization of radical generation. **IUBMB Life**, v.51, p.377–380, 2001b.

CHING, T-L.; DE JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**, v.218, p.377–381, 1994.

CHISTÉ, R.C. et al. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. **Life Sciences**, v.99, p.52–60, 2014.

CHISTÉ, R.C. et al. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v.135, p.1740–1749, 2012.

CLEMENS, M.R.; WALLER, H.D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.45, p.251–268, 1987.

CONFORTI, F. et al. Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), *in vitro* inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. **Food Chemistry**, v.129, p.1413–1419, 2011.

COUTINHO, E.F.; RIBEIRO, F.C.; CAPPELLARO, T.H. (Ed.) **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. (Sistemas de Produção, 16). Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/783494> >. Acesso em: 07 nov. 2015.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.854, p.435–442, 1998.

CVJETICANIN, T. et al. Dried leaf extract of *Olea europaea* ameliorates islet-directed autoimmunity in mice. **British Journal of Nutrition**, v.103, p.1413–1424, 2010.

CZERWINSKA, M.; KISS, A.K.; NARUSZEWICZ, M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. **Food Chemistry**, v.131, p.940–947, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313–7352, 2010.

DE BOCK, M. et al. Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.57, p.2079–2085, 2013.

DEKANSKI, D. et al. Effects of high dose olive leaf extract on the hemodynamic and oxidative stress parameters in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.79, n.9, p.1085–1097, 2014.

DE LA PUERTA, R. et al. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrergic neurotransmission. **Life Sciences**, v.69, p.1213–1222, 2001.

DE LEONARDIS, A. et al. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. **European Food Research and Technology**, v.226, p.653–659, 2008.

DE OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689–702, 2009.

DE OLIVEIRA, S.; SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.44, p.63–74, 2010.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47–95, 2002.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343–350, 2003.

EL, S.N.; KARAKAYA, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutrition Reviews**, v.67, n.11, p.632–638, 2009.

ERBAY, Z.; ICIER, F. The importance and potential uses of olive leaves. **Food Reviews International**, v.26, p.319–334, 2010.

EUCH, S.K.E.; BOUJILA, J.; BOUZOUTA, N. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.1100–1105, 2015.

EWING, J.F.; JANERO, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical Biochemistry**, v.232, p.243–248, 1995.

FAINE, L.A. et al. Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.57, p.221-226, 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FERREIRA, I.C.F.R. et al. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. **Food Chemistry**, v.103, p.188-195, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p.1043-1048, 2011.

FLORIANO-SÁNCHEZ, E. et al. Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. **Free Radical Research**, v.40, n.5, p.523-533, 2006.

FRANCO, M.N. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. **Food Chemistry**, v.163, p.289-298, 2014.

FRITSCHKE, K.; MCGUIRE, S. The use of dietary synthetic antioxidants at recommended levels does not alter rat immune cell eicosanoid production or hepatic vitamin E concentration. **Nutrition Research**, v.17, n.8, p.1311-1319, 1997.

GEETHA, T. et al. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. **Mutation Research**, v.556, p.65-74, 2004.

GHANBARI, R. et al. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) - A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.3291-3340, 2012.

GIÃO, M.S. et al. Plant aqueous extracts: antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection. **Food Control**, v.21, p.633-638, 2010.

GONÇALVES, F.S. **Hemoglobina**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/sangue/hemoglobina/>>. Acesso em: 05 nov. 2015.

GONÇALVES, P.M.F. **Efeitos de metabólitos de fenóis do azeite no dano oxidativo em eritrócitos humanos**. 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2013. Disponível em: <<http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/70049/2/11515.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2015.

GOULAS, V. et al. Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.3303-3308, 2010.

GOVARES, A. et al. Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. **South African Journal of Animal Science**, v.40, n.2, p.145–155, 2010.

GOVINDAN, P.; MUTHUKRISHNAN, S. Evaluation of total phenolic content and free radical scavenging activity of *Boerhavia erecta*. **Journal of Acute Medicine**, v.3, p.103-109, 2013.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen”. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v.12, n.1, p.426-428, 1879.

GUINDA, Á. et al. Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja del olivo: extracto de hexane. **Grasas y Aceites**, v.53, n.4, p.419-422, 2002.

GUINDA, Á. et al. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. **LWT-Food Science and Technology**, v.64, p.431-438, 2015.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v.86, p.345–391, 2012.

GUTTERIDGE, J.M.C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions**, v.91, p.133–140, 1994.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.899, n.1, p.136–147, 2000.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HARASYM, J.; OLEDZKI, R.O. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. **Nutrition**, v.30, p.511-517, 2014.

HASSEN, I.; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – a mini-review. **Journal of Functional Foods**, 2014. In press.

HAYES, J.E. et al. Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. **LWT-Food Science and Technology**, v.44, p.164-172, 2011a.

HAYES, J.E. et al. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v.126, p.948-955, 2011b.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, p.63-72, 2008.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUNG, H-C. et al. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**, v.96, n.21, p.1577-1584, 2004.

INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. **Market Newsletter** – September 2015, n.97, 2015. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/news/view/682-year-2015-news/628-market-newsletter-september-2015>>. Acesso em: 07 nov. 2015.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, v.136, p.237-244, 2013.

JEMAI, H. et al. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. **Chemico-Biological Interactions**, v.176, p.88-98, 2008.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K.J.K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v.94, p.220-227, 2013.

KATALINIC, V. et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v.94, p.550-557, 2006.

KHALATBARY, A.R. Olive oil phenols and neuroprotection. **Nutritional Neuroscience**, v.16, n.6, p.243-249, 2013.

KIM, S-J.; CHO, A.R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v.29, p.112-120, 2013.

KIM, T.S.; DECKER, E.A.; LEE, J. Antioxidant capacities of α -tocopherol, trolox, ascorbic acid, and ascorbyl palmitate in riboflavin photosensitized oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v.133, p.68-75, 2012.

- KIRITSAKIS, K. et al. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.87, p.369-376, 2010.
- KNIGHT, J.A. Free Radicals: their history and current status in aging and disease. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.28, n.6, p.331-346, 1998.
- KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v.30, n.6, p.620-650, 2002.
- KOLTOVER, V.K. Antioxidant biomedicine: from free radical chemistry to systems biology mechanisms. **Russian Chemical Bulletin**, International Edition, v.59, n.1, p.37-42, 2010.
- KONTOGIANNI, V.G.; GEROTHANASSIS, I.P. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. **Natural Product Research**, v.26, n.2, p.186-189, 2012.
- KONYALIOGLU, S.; KARAMENDERES, C. The protective effects of *Achillea* L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.221-227, 2005.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p.217-233, 2011.
- KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. **Free Radical Biology & Medicine**, v.12, p.63-81, 1992.
- LAGUERRE, M. et al. Characterization of olive-leaf phenolics by ESI-MS and evaluation of their antioxidant capacities by the CAT assay. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.86, p.1215-1225, 2009.
- LEE, O-H. et al. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. **Bioresource Technology**, v.100, p.6107-6113, 2009.
- LEE, O-H.; LEE, B-Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, v.101, p.3751-3754, 2010.
- LI, H.; ZHANG, M.; MA, G. Radical scavenging activity of flavonoids from *Trollius chinensis* Bunge. **Nutrition**, v.27, p.1061-1065, 2011.
- LIU, R.H.; HOTCHKISS, J.H. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: A review. **Mutation Research**, v.339, p.73-89, 1995.
- LOCKYER, S. et al. Olive leaf phenolics and cardiovascular risk reduction: physiological effects and mechanisms of action. **Nutrition and Aging**, v.1, n.2, p.125-140, 2012.
- LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v.763, p.1-10, 2013.

- LÜ, J.-M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.14, p.840-860, 2010.
- LUND, M.N. et al. Protein oxidation in muscle foods: a review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.55, p.83-95, 2011.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.
- MALIK, N.S.A.; BRADFORD, J.M. Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.6, n.2, p.8-13, 2008.
- MANNA, C. et al. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.10, p.159-165, 1999.
- MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginko biloba* extract EGb 761. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.201, n.2, p.748-755, 1994.
- MARQUES, G.S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia fortificata* link. **Química Nova**, v.35, n.3, p.517-522, 2012.
- MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.22, p.6049-6055, 1969.
- MEIRINHOS, J. et al. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea Europaea* L.) leaf cultivars. **Natural Product Research**, v.19, n.2, p.189-195, 2005.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.
- MOUREU, C.; DUFRAISSE, C. Catalysis and auto-oxidation. Anti-oxygenic and pro-oxygenic activity. **Chemical Reviews**, v.3, n.2, p.113-162, 1926.
- MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.2, p.168-178, 2007.
- MYLONAKI, S. et al. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.392, p.977-985, 2008.

NASSU, R.T. et al. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. **Meat Science**, v.63, p.43-49, 2003.

NEERGHEEN, V.S. et al. Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.787-799, 2006.

NEKOOEIAN, A.A. et al. The effect of hydroalcoholic extract of olive leaves on blood pressure in rat model of two-kidney, one-clip goldblatt hypertension. **Iranian Cardiovascular Research Journal**, v.5, n.1, p.1-6, 2011.

NIKI, E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.1119S-1124S, 1991.

OLIVERAS-LÓPEZ, M-J. et al. Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.57, p.234-242, 2013.

OMAR, S.H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. **Scientia Pharmaceutica**, v.78, p.133-154, 2010.

OMER, S.A. et al. Toxicity of olive leaves (*Olea europaea* L.) in Wistar albino rats. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.7, n.11, p.1175-1182, 2012.

ORAK, H.H.; ISBILIR, S.S.; YAGAR, H. Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. **Food Science and Biotechnology**, v.21, n.4, p.1065-1074, 2012.

PAIVA-MARTINS, F. et al. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.53, p.609-616, 2009a.

PAIVA-MARTINS, F. et al. Effects of the olive oil phenol metabolite 3,4-DHPEA-EDAH₂ on human erythrocyte oxidative damage. **Food & Function**, v.6, p.2350-2356, 2015.

PAIVA-MARTINS, F. et al. Powerful protective role of 3,4-dihydroxyphenylethanol elenolic acid dialdehyde against erythrocyte oxidative-induced hemolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.135-140, 2010.

PAIVA-MARTINS, F. et al. Protective activity of hydroxytyrosol metabolites on erythrocyte oxidative-induced hemolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.6636-6642, 2013.

PAIVA-MARTINS, F. et al. The effect of olive leaf supplementation on the constituents of blood and oxidative stability of red blood cells. **Journal of Functional Foods**, v.9, p.271-279, 2014.

PAIVA-MARTINS, F. et al. The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. **Meat Science**, v.82, p.438-443, 2009b.

- PAIVA-MARTINS, F.; GORDON, M.H.; GAMEIRO, P. Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.124, p.23–36, 2003.
- PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v.155, n.2, p.131-136, 2011.
- PAPOTI, V.T.; TSIMIDOU, M.Z. Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.3470-3477, 2009.
- PARK, J-H. et al. Olive leaf down-regulates the oxidative stress and immune dysregulation in streptozotocin-induced diabetic mice. **Nutrition Research**, v.33, p.942–951, 2013.
- PEREIRA, A.P. et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. **Molecules**, v.12, p.1153-1162, 2007.
- PEREIRA, W.A.B.; HATAYDE, M.R.; FARIA, J.L.M. Uso da técnica de microscopia eletrônica de varredura para determinação de alterações eritrocitárias em ovinos intoxicados experimentalmente com cobre. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.2, p.275-283, 2011.
- PERSSON, T.; POPESCU, B.O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2014, p.1–11, 2014.
- PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.97, p.55–74, 2015.
- POOJA, P.S.; SAMANTA, K.C.; GARG, V. Evaluation of nitric oxide and hydrogen peroxide scavenging activity *Dalbergia sissoo* roots. **Pharmacophore**, v.1, n.2, p.77-81, 2010.
- PORT'S, P.S. et al. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v.53, p.875-881, 2013.
- PREISER, J-C. Oxidative stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.36, p.147-154, 2012.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v.2, n.2, p.219-236, 2007.
- RAHMANIAN, N.; JAFARI, S.M.; WANI, T.A. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. **Trends in Food Science & Technology**, v.42, p.150-172, 2015.

RAVAL, J.S. et al. Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage. **Transfusion Medicine**, v.23, p.87–93, 2013.

REDDY, C.S.S.S. et al. *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1355–1364, 2007.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.9/10, p.1231–1237, 1999.

RIETJENS, S.J.; BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M. New Insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7609–7614, 2007.

ROBY, M.H.H. et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.827–831, 2013.

RODRIGUES, F.; PIMENTEL, F.B.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Olive by-products: challenge application in cosmetic industry. **Industrial Crops and Products**, v.70, p.116–124, 2015.

RODRÍGUEZ-ROJO, S. et al. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.98–103, 2012.

ROLEIRA, F.M.F. et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. **Food Chemistry**, v.183, p.235–258, 2015.

SAMPAIO, G.R. et al. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.135, p.1383–1390, 2012.

SATO, Y. et al. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator. **Biochemistry**, v.34, p.8940–8949, 1995.

SCHAICH, K.M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, 2015. In press.

SCHMITT, F.-J. et al. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1837, p.835–848, 2014.

SCOGNAMIGLIO, M. et al. Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy). **Food Research International**, v.46, p.294–303, 2012.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v.44, n.3, p.158–163, 2000.

- SHAN, B. et al. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1879-1885, 2009.
- SHEN, L.; JI, H-F.; ZHANG, H-Y. How to understand the dichotomy of antioxidants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.362, p.543-545, 2007.
- SHUKLA, S. et al. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.64, p.807-811, 2012.
- SIMÃO, A.N.C. et al. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-azobis (amidinopropane). **Life Sciences**, v.78, p.1202-1210, 2006.
- SINDHI, V. et al. Potential applications of antioxidants - a review. **Journal of Pharmacy Research**, v.7, p.828-835, 2013.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI JUNIOR, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p.144-158, 1965.
- SONI, M.G. et al. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.903-915, 2006.
- STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, v.258, p.1898-1902, 1992.
- STANDING COMMITTEE ON THE SCIENTIFIC EVALUATION OF DIETARY REFERENCES INTAKES. **Dietary reference intakes: proposed definition and plan for review of dietary antioxidants and related compounds**. Washington: National Academy Press, 1998. Disponível em: < <http://www.nap.edu/catalog/6252/dietary-reference-intakes-proposed-definition-and-plan-for-review-of>>. Acesso em: 05 nov. 2015.
- STEER, P. et al. Cardiac and vascular structure and function are related to lipid peroxidation and metabolism. **Lipids**, v.37, n.3, p.231-236, 2002.
- SU, M-S.; SHYU, Y-T.; CHIEN, P-J. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. **Food Chemistry**, v.111, p.892-896, 2008.
- SUDJANA, A.N. et al. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, p.461-463, 2009.
- SUWALSKY, M. et al. Human erythrocytes and molecular models of cell membranes are affected in vitro by *Balbisia peduncularis* (Amancay) extracts. **Chemico-Biological Interactions**, v.179, p.413-418, 2009.

- TAAMALLI, A. et al. The occurrence and bioactivity of polyphenols in tunisian olive products and by-products: a review. **Journal of Food Science**, v.77, n.4, p.R83-R92, 2012.
- TABERA, J. et al. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4774–4779, 2004.
- TAGLIAFIERRO, L. et al. The protective role of olive oil hydroxytyrosol against oxidative alterations induced by mercury in human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.82, p.59–63, 2015.
- TALHAOU, N. et al. Determination of phenolic compounds of ‘Sikitita’ olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive leaves. **LWT-Food Science and Technology**, v.58, p.28–34, 2014.
- TAYOUB, G. et al. Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v.2, n.3, p.428-433, 2012.
- TESORIERI, L. et al. Exposure to malondialdehyde induces an early redox unbalance preceding membrane toxicity in human erythrocytes. **Free Radical Research**, v.36, n.1, p.89-97, 2002.
- THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.669-675, 2006.
- TÓTH, G. et al. Phenolic profiling of various olive bark-types and leaves: HPLC–ESI/MS study. **Industrial Crops and Products**, v.67, p.432-438, 2015.
- TRINDADE, R.A.; MANCINI-FILHO, J.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Natural antioxidants protecting irradiated beef burgers from lipid oxidation. **LWT- Food Science and Technology**, v.43, p.98-104, 2010.
- TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chemistry**, v.100, p.81-90, 2007.
- TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v.851, p. 51-70, 2007.
- TULIPANI, S. et al. Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. **Food Chemistry**, v.128, p.180-186, 2011.
- VALENTÃO, P. et al. Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.3476-3479, 2001.

VALENTÃO, P. et al. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.4989-4993, 2002.

VALENTÃO, P. et al. Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small Centaury (*Centaureum erythraea*) infusion. A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). **Phytomedicine**, v.10, p.517-522, 2003.

VALENZUELA, B.A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. **Grasas y Aceites**, v.54, n.3, p.295-303, 2003.

VALKO et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VALLADA, E.P. **Manual de técnicas hematológicas**. São Paulo: Atheneu. 1997

VIROT, M. et al. New microwave-integrated Soxhlet extraction - an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. **Journal of Chromatography A**, v.1174, p.138-144, 2007.

VISIOLI, F.; BELLOMO, G.; GALLI, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.247, p.60-64, 1998.

VISIOLI, F. et al. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.104, p.677-684, 2002.

VISIOLI, F.; GALLI, C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. **Nutrition Reviews**, v.56, n. 5, p.142-147, 1998.

WANG, X. et al. Efficient method for screening and identification of radical scavengers in the leaves of *Olea europaea* L. **Biomedical Chromatography**, v.25, p.373-380, 2011.

WEISS, S.J. et al. Chlorination of taurine by human neutrophils. **The Journal of Clinical Investigation**, v.70, p.598-607, 1982.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J.; WHYSNER, J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.1027-1038, 1999.

WINTERBOURN, C.C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v.186, p.265-272, 1990.

XIE, P-J. et al. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure-activity relationships. **Journal of Functional Foods**, v.16, p.460-471, 2015a.

XIE, P-J. et al. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. **Food and Bioproducts Processing**, v.93, p.29-38, 2015b.

- XYNOS, N. et al. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v.122, p.323–330, 2014.
- YANG, H-L. et al. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1513-1521, 2006.
- YEN, G-C.; LAI, H-H.; CHOU, H-Y. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinite* root. **Food Chemistry**, v.74, p.471-478, 2001.
- ZARE, L. et al. Oleuropein, chief constituent of olive leaf extract, prevents the development of morphine antinociceptive tolerance through inhibition of morphine-induced L-type calcium channel overexpression. **Phytotherapy Research**, v.26, p.1731-1737, 2012.
- ZASLAVER, M. et al. Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.9934–9939, 2005.
- ZHANG, J. et al. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. **Food Chemistry**, v.145, p.57–65, 2014.
- ZOU, C-G.; AGAR, N.S.; JONES, G.L. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. **Life Sciences**, v.69, p.75–86, 2001.
- ZULUETA, A.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v.114, p.310–316, 2009.

APÊNDICE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O Sr. (sra.) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa "Atividade antioxidante de extratos de plantas – ensaios químicos e em sistemas biológicos *in vitro*", de responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.

Esta pesquisa pretende avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas (hortelã, orégano, alecrim e oliveira) por diferentes metodologias analíticas *in vitro* e diretamente em células de sangue humano (eritrócitos), utilizados como modelos experimentais. Espera-se com este estudo identificar efeito antioxidante destas plantas em processos bioquímicos celulares, sugerindo que sua ingestão pode ser benéfica à saúde, dada sua ação antioxidante em sistemas biológicos.

Sua participação nesta pesquisa consistirá na doação de sangue venoso, sem que o sr. (sra.) receba nenhum tipo de tratamento ou intervenção. As coletas de sangue serão realizadas por profissional habilitado na Unidade Básica de Saúde (UBAS) do campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Será realizada uma coleta de 10 mL de sangue quinzenalmente, durante 1 ano.

Não há riscos previsíveis associados à sua participação nesta pesquisa, uma vez que apenas será realizada coleta de sangue, sem que haja nenhum tipo de tratamento ou intervenção.

Durante todo o período da pesquisa, o sr. (sra) tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isto entrar em contato com a pesquisadora responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FZEA/USP.

O sr. (sra.) tem o direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. O sangue coletado será devidamente descartado imediatamente após a realização das análises laboratoriais, sem que haja depósito ou armazenamento deste material.

O sr. (sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Autorização

Eu, _____, _____ anos, RG _____, após leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com a pesquisadora responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto, expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Pirassununga, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário para participação neste estudo.

Pirassununga, _____ de _____ de _____.

Assinatura da pesquisadora responsável

Dados da pesquisadora responsável

Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Departamento de Ciências Básicas

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Universidade de São Paulo

Av. Duque de Caxias Norte, 225 – CEP13635-000 – Pirassununga/SP

(19) 3565-4276 / mpmelo@usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FZEA/USP

Av. Duque de Caxias Norte, 225 – CEP13635-000 – Pirassununga/SP

(19) 3565-4299 / apoiiofzea@usp.br

ANEXO – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ZOOTECNIA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade antioxidante de extratos de plantas - Ensaio químicos e em sistemas biológicos in vitro

Pesquisador: Mariza Pires de melo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24394513.0.0000.5422

Instituição Proponente: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 493.382

Data da Relatoria: 11/12/2013

Apresentação do Projeto:

Este estudo será desenvolvido para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de folhas de plantas (hortelã, orégano, alecrim e oliveira) e seus efeitos em sistemas biológicos, por diferentes metodologias analíticas in vitro e em nível celular (in situ). Espera-se que os extratos vegetais em estudo apresentem capacidade antioxidante tanto in vitro como in situ, sugerindo que a ingestão de alimentos contendo estes compostos antioxidantes pode ser benéfica à saúde, uma vez que estes atuam também como antioxidantes em sistemas biológicos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente projeto será avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas (hortelã, orégano, alecrim e oliveira), por diferentes metodologias analíticas in vitro e in situ.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Considero não haver riscos aos voluntários, uma vez que será realizada somente a coleta de sangue venoso de três pessoas saudáveis e não fumantes, sem que estas pessoas tenham recebido nenhum tipo de tratamento ou intervenção. As coletas de sangue serão realizadas por profissional habilitado na Unidade Básica de Saúde (UBAS) do campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo (USP). Serão realizadas no total 24 coletas de sangue de cada pessoa, em um período total

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225

Bairro: Campus Universitário da USP

CEP: 13.635-900

UF: SP

Município: PIRASSUNUNGA

Telefone: (19)3565-4299

Fax: (19)3565-4114

E-mail: ghelena@usp.br

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA USP

Continuação do Parecer: 493.382

de um ano (1 coleta quinzenalmente)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trata de um assunto de grande relevância, que pode contribuir de forma positiva para saúde humana. Espera-se que os extratos vegetais em estudo apresentem capacidade antioxidante, sugerindo que a ingestão de alimentos contendo estes compostos antioxidantes possa ser benéfica à saúde, uma vez que estes atuariam também como antioxidantes em sistemas biológicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão em conformidade.

Recomendações:

Recomendo a aprovação do presente projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está apresentado de forma clara e objetiva, com coerência e sem restrição ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP-FZEA aprova o projeto em questão por unanimidade de votos.

PIRASSUNUNGA, 13 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Marco Antonio Trindade
(Coordenador)

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225

Bairro: Campus Universitário da USP

CEP: 13.635-900

UF: SP

Município: PIRASSUNUNGA

Telefone: (19)3565-4299

Fax: (19)3565-4114

E-mail: ghelena@usp.br