UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

Rafaella Câmara Rocha Menezes

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS E SEGURANÇA ALIMENTAR: FOLHAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea L*)

Porto Alegre
2019

Câmara Rocha Menezes, Rafaella
DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS E SEGURANÇA ALIMENTAR: FOLHAS DE OLIVEIRA (Olea europaea L) / Rafaella Câmara Rocha Menezes. -- 2019.
110 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, 2019.

Orientador(a): Simone Morelo Dal Bosco ; coorientador(a): Juliano Garavaglia, Eliane Dallegrave.

1. Oleuropeína. 2. Folha de oliveira. 3. Desenvolvimento de produtos. 4. Toxicologia . I. Título.

RAFAELLA CÂMARA ROCHA MENEZES

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS E SEGURANÇA ALIMENTAR: FOLHAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea L*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª. Simone Morelo Dal Bosco

Co-orientadores: Prof. Dr. Juliano Garavaglia

Profª. Drª. Eliane Dallegrave

Porto Alegre
2019

A todas as confluências do universo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Simone Morelo Dal Bosco, pela honra em dividir os conhecimentos, pela paciência infindável e pela humanidade tão essencial nas relações. Sou eternamente grata por termos cruzado nossos caminhos e por ter me possibilitado viver o mestrado de forma tão completa.

Ao meu co-orientador Juliano Garavaglia, pela extrema generosidade, pela disponibilidade tão fundamental e pelas contribuições valiosas. A excelência do seu trabalho é uma constante inspiração.

À minha co-orientadora Eliane Dallegrave, pela confiança imensurável, pela entrega em sua prática diária, por me mostrar muito além da própria pesquisa. Meu mais sincero agradecimento por todos os ensinamentos, pelo empenho e por me acolher com tanto carinho durante esse projeto.

A todos os participantes da pesquisa que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho - vocês são fundamentais para esta realização.

A todas as ratas envolvidas, meu profundo agradecimento por terem oferecido o que há de mais importante em prol do desenvolvimento da ciência.

Às co-autoras do artigo 2, Kathleen Kruger e Larissa Faccioli, por também terem dado sempre mais e o melhor de si. Em especial, à amiga Marina Tuerlinckx, por ter me amparado amorosamente e atentamente partilhado suas experiências.

Aos demais colegas e professores do PPG-Nutrição, por também terem experienciado essa aventura.

Aos familiares, pela presença e motivação diárias.

Aos amigos, pela diversão e risadas necessárias.

Aos meus pais, por terem me possibilitado diversas oportunidades que me fizeram chegar até aqui.

À UFCSPA, pela infraestrutura ofertada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 15
2 REREFENCIAL TEÓRICO..... 16
2.1 OLEA EUROPAEA L..... 16
2.2 FOLHA DE OLIVEIRA..... 19
2.3 OLEUROPEÍNA..... 22
3 JUSTIFICATIVA..... 27
3.1 PROJETO 1..... 27
3.2 PROJETO 2..... 27
4 OBJETIVO..... 28
4.1 OBJETIVO GERAL - PROJETO 1..... 28
4.1.1 Objetivos específicos - Projeto 1..... 28
4.2 OBJETIVO GERAL - PROJETO 2..... 28
4.2.1 Objetivos específicos - Projeto 2..... 28
5 SISTEMÁTICA DE BUSCA DE REFERÊNCIAS DA LITERATURA..... 29
6 PATENTE DE INVENÇÃO DA FARINHA DE FOLHA DE OLIVEIRA..... 37
6.1 RELATÓRIO DE INVENÇÃO..... 37
6.1.1 Título Proposto para a Invenção..... 38
6.1.2 Descrição detalhada do invento..... 38
7 ARTIGO..... 46
8 PATENTE DE INVENÇÃO DE COOKIES DE FARINHA DE FOLHA DE OLIVEIRA.....

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....
10 ARTIGO DE REVISÃO.....
11 ANEXOS.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME - 2-metoxiestradiol

ADQ - Análise descritivo-quantitativa

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

AST - Aspartato aminotransferase

BW - Peso corporal

CD - Dieta convencional

CEP - Comitê de ética em pesquisa em humanos

CEUA - Comitê de ética e Uso de Animais

CK-NAC - Creatina Quinase

COX - Ciclooxigenase

DMS - Diferença mínima significativa

DOX - Doxorrubicina

DP - Desvio-Padrão

DW - Peso seco

EC-LPS - Escherichia coli

EVOO - Azeite de oliva extra-virgem

FW - Peso fresco

HCD - Dieta rica em colesterol

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HFD - Dieta rica em gordura

HR - Frequência cardíaca

HW - Peso do coração

I.v – Intravenoso

I.p – Intraperitoneal

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MAP - Pressão arterial média

MAPK - Proteína-quinase ativada por mitógeno

MCH - Hemoglobina corpuscular média

MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV - Volume corpuscular médio

MeSH - Medical Subject Headings

NK - Não conhecido

Nrf2 - fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OLE - Extrato de folha de oliveira

OLEU / OL - oleuropeína

OS - Osteossarcoma

PLT - Plaquetas

PVN - Núcleo paraventricular

PVN - Núcleo paraventricular do hipotálamo

RBC - Eritrócitos

Ref - Referências

SBP - Pressão arterial sistólica

SHR - Ratos espontaneamente hipertensos

SIRT1 - Sirtuina1

TAG - Triglicerídeos

TCHO - Colesterol total

UC - Colite ulcerativa

UHPLC - Cromatografia líquida de ultra performance

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

VT - Taquicardia ventricular

WBC - Leucócitos

WHO - Organização mundial da saúde

WKY - Ratos Wistar-Kyoto

RESUMO

As folhas de oliveira (*Olea europea L)* possuem um potencial antioxidante devido a presença de polifenóis, como a oleuropeína. Estudos mostram um potencial benéfico a partir do consumo de oleuropeína, ainda que muitos estejam em fase experimental e não tenham sido desenvolvidos com a população humana. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma patente de método de produção de farinha de oliveira, avaliando seu perfil toxicológico e aplicação comercial através do desenvolvimento de produtos. Para isso, o processo de produção da farinha de folha de oliveira foi fundamentado através de uma patente. Em seguida, a fim de avaliar a segurança alimentar da farinha de folha de oliveira, foi realizada avaliação de toxicidade subcrônica (OECD 407) em ratas Wistar Após, foi verificado potencial de aplicação em produtos alimentícios através de cookies adicionados de farinha de folha de oliveira. Os resultados encontrados através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) indicam que a farinha produzida possui oleuropeína (160.76 ± 3.01 mg/g DW) em quantidades promissoras. Os dados do teste de toxicidade subcrônica demonstram que os animais tratados com farinha de folha de oliveira reduziram o ganho de peso em relação ao grupo controle ($p<0.001$), não havendo alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos.Para a elaboração de cookies de farinha de folha de oliveira foi avaliada a estabilidade da oleuropéina pós-cocção através do HPLC sendo presente em todos os grupos amostrais testados. Na análise descritivo-quantitativa com painelistas treinados ($n=11$) os atributos que apresentaram diferença estatística foram aroma herbáceo e maciez ($p<0,05$). Por fim, as folhas de oliveira se apresentam como um potencial insumo a ser absorvido pelo mercado interno devido ao seu potencial benéfico à saúde humana. A

utilização de um produto subexplorado apresenta-se como uma oportunidade para a indústria de alimentos. Embora, devido ao baixo número de estudos de toxicidade e, consequentemente, em humanos, são necessários dados mais consistentes para afirmar a segurança do produto. A inovação em produtos alimentícios representa uma janela de conjuntura favorável ao desenvolvimento de produtos que visem a melhoria da saúde.

PALAVRAS-CHAVES: *folha de oliveira, oleuropeina, olea europea l, desenvolvimento de produtos, segurança alimentar*

ABSTRACT

Olive leaves (Olea europea L) have an antioxidant potential due to the presence of polyphenols, such as oleuropein. Studies show a beneficial potential from the consumption of oleuropein, although many are in experimental phase and have not been developed with the human population. The objective of this work was to elaborate a patent for the method of production of olive meal, evaluating its toxicological behavior and commercial application through the development of products. For this, the process of production of the olive leaf flour was based on a patent. Afterwards, in order to evaluate the food safety of the olive leaf meal, a subchronic toxicity evaluation (OECD 407) was carried out in Wistar rats. Afterwards, it was verified the potential of application in food products through cookies added with olive leaf flour. The results obtained by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) indicate that the flour produced has oleuropein (160.76 ± 3.01 mg / g DW) in promising amounts. The data from the subchronic toxicity test showed that the animals treated with olive leaf meal reduced weight gain in relation to the control group ($p < 0.001$). There were no changes in the hematological and biochemical parameters. For the preparation of flour cookies of olive leaf the stability of post-cooking oleuropine through HPLC was evaluated and was present in all tested sample groups. In the descriptive-quantitative analysis with trained panelists ($n = 11$) the attributes that presented statistical difference were herbaceous aroma and softness ($p < 0.05$). Finally, the olive leaf presents as a potential input to be absorbed by the internal market due to its potential beneficial to human health. The use of an under-exploited product presents itself as an opportunity for the food industry. Although, due to the low number of toxicity studies and therefore in humans, more

consistent data is needed to assert product safety. Innovation in food products represents a window of opportunity favorable to the development of products aimed at improving health.

KEYWORDS: *olive leaf, oleuropein, olea europea l, product development, food safety.*

1. INTRODUÇÃO

O uso das folhas de oliveira para consumo alimentar é relativamente nova no Brasil. O salto no número de pesquisas realizadas com a folha de oliveira ou com a oleuropeína (seu principal composto bioativo) a nível global ainda não gerou impactos no mercado brasileiro. Tendo isso em vista, não há produtos ainda sendo comercializados com, seja folha de oliveira, seja oleuropeína, na sua composição. Entretanto, fora do Brasil, principalmente na América do Norte e na Ásia já é possível encontrar suplementos à base de folha de oliveira e oleuropeína sendo vendidos livremente em supermercados e farmácias.

A partir da indicação da literatura internacional sobre a importância de compostos presente na folha de oliveira, desenvolveu-se uma linha de pesquisa que estuda atributos e aplicações para estas folhas resultantes de plantações de oliva (*Olea Europaea L*) do estado do Rio Grande do Sul. Sendo assim, esta dissertação de mestrado é constituída por dois projetos de pesquisa: (1) Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica de farinha de folha de oliveira em ratas Wistar e (2) Desenvolvimento de biscoitos adicionados de farinha de folha de oliveira e seu potencial para a saúde humana; ambos aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) e Comitê de ética em pesquisa em humanos (CEP), respectivamente, com os pareceres em anexo.

Para isso, foi elaborada a farinha da folha de oliveira contemplada neste trabalho em forma de patente. Após, foi realizada avaliação de toxicidade subcrônica de ratas Wistar relativas à farinha da folha de oliveira, que compõe o primeiro artigo desta dissertação. A partir da elaboração da farinha, foi elaborado um *cookie* a fim de testar a estabilidade da oleuropeína referente a temperatura e estocagem e os aspectos sensoriais do produto, visando o potencial comercial contemplado também em forma de patente. Por fim, foi realizada uma revisão sistemática que aborda as principais evidências que trabalharam folhas de oliveira e/ou oleuropeína em trabalhos experimentais com roedores e doenças cardiovasculares, apresentado também neste trabalho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O desenvolvimento de um produto funcional que possua propriedades benéficas aos consumidores possui uma larga trajetória até a sua comercialização. Tal qual um medicamento percorre uma série de etapas até a chegada nas prateleiras da farmácia, um produto alimentício exige uma sucessão de avais até a sua distribuição. Se para os medicamentos a descoberta de uma nova molécula é o ponto de partida, na elaboração de produtos com propriedades funcionais, um composto bioativo tem esse papel.

A elaboração deste referencial se baseia em explanar desde algumas características das oliveiras (*Olea europaea L*) até os principais achados da literatura envolvendo folhas de oliveira. Todos esses tópicos baseados no principal composto que sustenta os efeitos benéficos do consumo das folhas: a oleuropeína.

2.1 OLEA EUROPAEA L

A oliveira (*Olea europaea L*) é uma árvore pertencente à família botânica *Oleaceae.* Esta família é encontrada mais facilmente em regiões temperadas e tropicais do mundo (1). Sua origem se deu na região mediterrânica, principalmente no sul da Europa, norte da África e Oriente Médio. É uma árvore de médio porte, podendo alcançar 15 metros de altura. Uma das frutíferas mais antigas utilizadas pela espécie humana, com o cultivo que remonta a 6.000 anos. É uma das culturas plantadas na Europa que possui maior longevidade, podendo ultrapassar os 1500 anos de idade (1,2).

A região mediterrânica é responsável por 98% da área de oliveiras cultivadas mundialmente (3). No Brasil, o plantio desta espécie está localizado principalmente nas regiões Sul e Sudeste, principalmente devido ao clima propício ao seu desenvolvimento. Sobre o clima mais propício para sua produção, Coutinho (p. 18) explica que “no clima mediterrâneo, durante o inverno, ocorre acumulação de frio, a qual é considerada indispensável para que a oliveira saia da dormência e atinja, posteriormente, florescimento uniforme”. Ele ainda continua esclarecendo a importância da temperatura, no qual “o limiar de temperatura, isto é, a temperatura base, abaixo da

qual não ocorre crescimento, é de 12,5^{o}C". Nos países do mediterrâneo, ainda de acordo com Coutinho, a temperatura mais adequada para que ocorra a frutificação efetiva normal não deve superar os 35°C ou ser inferior aos 25°C. Todavia, a espécie é capaz de suportar altas temperaturas no verão (40°C) sem que os ramos e folhas sofram queimaduras. Contudo, a atividade fotossintética começa a ser inibida quando a temperatura ultrapassa os 35°C.

Imagem 1 - Oliveira (*Olea europaea L*)

Fonte: Museu da Biodiversidade

A densidade das árvores depende do método de poda. A poda precoce não é essencial, mas é frequentemente praticada para obter caules mais fortes. Entretanto, para as árvores mais velhas, a poda invernal é necessária para que haja um maior

rendimento (4). Nas culturas do Rio Grande do Sul, as podas são realizadas duas vezes ao ano, produzindo uma quantidade considerável de galhos ricos em folhas que, na maior parte das vezes, são descartados. Além disso, durante a colheita, quando utilizada a colheita mecanizada, também há grande perda de galhos e folhas que geralmente não são reutilizados.

Conforme dados disponibilizados pelo Ministério da Agricultura, algumas pragas são comuns ao cultivo da oliveira, tal qual a *Palpita unionalis*, conhecida como traça-da-oliveira; *Saissetia oleae*, conhecida como cochonilha ou cochonilha-parda; e, o *Tetranychus urticae*, também chamado de ácaro rajado.

Além disso, alguns produtos formulados são aprovados para uso em plantações de oliva. O inseticida Espinetoram é permitido para uso em concentração de 250g/kg a 25% da composição, sendo considerado medianamente tóxico aos seres humanos e muito perigoso ao meio-ambiente. Já o acaricida à base do fenpiroximato, do grupo dos pirazóis, é permitido quando usado em 50g/L a 5% - sendo considerado altamente tóxico aos seres humanos e também muito perigoso ao meio-ambiente. Ambos produtos também são legislados para uso em outras culturas (5).

Para cultivos orgânicos, não é permitido nenhum uso de agrotóxicos ou defensivos agrícolas. A plantação orgânica já é presente no Rio Grande do Sul, o que é favorecido pelas condições climáticas e do solo.

O principal produto econômico das oliveiras está relacionado ao seu fruto, as olivas, também conhecidas como azeitonas. A partir da produção de azeitonas é possível produzir o azeite de oliva, extra-virgem ou virgem. É considerado extra-virgem quando proveniente da primeira prensa do fruto. O azeite extra-virgem (EVOO), por sua vez, tem sido estudado em todo o mundo para averiguação das propriedades antioxidantes associados ao seu consumo (6, 7, 8).

Estes efeitos são atribuídos aos efeitos sinérgicos da sua ingestão, tendo como componente majoritário o ácido oleico. O estudo de Yubero-Serrano (9) avaliou que enquanto o principal ácido de EVOO, o ácido oleico, é considerado importante para os efeitos cardioprotetores registrados, o EVOO possui outras propriedades biológicas que dependem ou são potencializadas por outros componentes também presentes no azeite.

Quadro 1 - Principais componentes de EVOO

Triacilgliceróis
Ácido oleico (C18: 1) (55–83% de EVOO)
Ácido linoléico (C18: 2) (3,5 a 21% de EVOO)
Ácido palmítico (C16: 0) (7,5-20% de EVOO)
Ácido esteárico (C18: 0) (0,5 a 5% de EVOO)
Ácido linolênico (C18: 3) (especificamente ácido α-linolênico, 0,1-1,5% EVOO)
Ésteres não-glicericos
Tocoferóis
Esteróis
Ácidos terpênicos
Pigmentos
Clorofilas
Carotenóides
Polifenóis
Hidroxitirosol
Oleuropeína
Tirosol
Ácido cafeico
Ligstroside
Ácido vanílico
Ésteres de hidroxitirosol

Fonte: Yubero-Serrano (2018) - Traduzido pela autora

É válido salientar os principais componentes do azeite de oliva (Quadro 1) tendo em vista que eles diferem dos compostos presentes nas folhas. O ácido oleico é visto em maior quantidade em EVOO, e ainda que presente, a oleuropeína é tida em menor quantidade. Já nas folhas de oliveira o encontrado difere dessa composição, tendo como principal composto a oleuropeína, seguida do tirosol.

A descoberta de novos componentes do azeite de oliva ainda é constante, sendo o desconhecimento um fator importante pelo desenvolvimento de pesquisas. *S- (E) -Elenolide* foi isolado do azeite de oliva no estudo de Rigakou (10) e sua estrutura

elucidada. O composto não-fenólico foi caracterizado através de Ressonância Magnética Nuclear e Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa. A pesquisa avaliou 2120 amostras de azeite tendo o composto presente na maior parte, com concentrações que variaram de 0 a 2821mg/kg.

2.2 FOLHA DE OLIVEIRA

As folhas de oliveira são resultado do debulhamento dos galhos. Suas folhas são com coreáceas de cutícula espessa. O teor dos nutrientes nas folhas é mais estável no período invernal, sendo esta época interessante para a realização de coletas (1). O estudo de Vogel (11) revisou os possíveis efeitos à saúde humana a partir do consumo da folha de oliveira e percebeu a partir dos resultados que:

> Polifenóis da folha de oliveira, especialmente a oleuropeína, tem efeitos interessantes sobre o corpo humano, tais como capacidade antioxidante, anti-hipertensivo, hipoglicêmico, hipocolesterolêmicos. No entanto, muitos desses efeitos foram testados apenas em animais e são necessários estudos com seres humanos para confirmar os benefícios atribuídos aos polifenóis da folha de oliveira. (Vogel, 2015, p. 1432)

O processamento dado à folha é um elemento central para conseguir ou não avaliar tais efeitos. Estudos utilizam diversas metodologias para o processamento das folhas a fim de avaliar os possíveis impactos a partir do seu consumo. A maior parte dos estudos optam por utilizar a folha de oliveira através do extrato elaborado, podendo ser metanólico, etanólico, aquoso e de diferentes concentrações (12, 13, 14). Além disso, alguns países, como Estados Unidos e China, já possuem o extrato da folha da oliveira (OLE) vendidos em cápsulas como suplementação para amplo consumo.

O método de extração da folha de oliveira influencia diretamente nas concentrações encontradas dos compostos. Diversos fatores como propriedades da própria matriz, solvente, tempo, temperatura e pressão intervém posteriormente não só na extração, mas na quantificação posterior desses compostos da amostra extraída. Além disso, o método escolhido para quantificação e identificação dos compostos também possui fatores que justificam as variações encontradas na literatura. A natureza da própria substância, o método de extração, tempo e condições de armazenamento, a seleção dos padrões utilizados, a presenças de substâncias interferentes e impurezas interferem nos valores encontrados (15).

O uso de OLE pode se dar de diferentes formas, extratos aquosos ou secos, de

concentrações distintas. As composições de OLE podem variar a depender da forma que foi feito o extrato. No estudo de Romero (16) foi feita a avaliação das folhas de oliveira de dois cultivares distintos, sendo a Picual e a Arbequina. Em ambos estudos o composto encontrado majoritariamente foi a oleuropeína. No Quadro 2 é possível acompanhar que mesmo em cultivares diferentes de azeitona, a composição no geral se mantém estável.

Quadro 2 - Compostos fenólicos (mg kg-1) em folhas de oliveira das cultivares Picual e Arbequina coletadas de novembro a abril que foram analisados durante a temporada 2012/2013.

	Oleuropeína		*Hy 4-glucoside*[y]		*Hy 1-glucoside*		Verbascosídeo		Outros	
Mês	Picual	Arbequina	Picual	Arbequina	Picual	Arbequina	Picual	Arbequina	Picual	Arbequina
Nov	72117 (10963) a	55577 (1567) a	772 (452) a	779 (16) a	243 (219) a	241 (16) a	533 (431) a	474 (102) a	206 (126) a	349 (17) a
Jan	54018 (5688) b	32539 (5978) b	1124 (592) a	1853 (430) b	337 (219) a	381 (55) b	805 (445) a	856 (322) b	218 (164) a	338 (79) a
Abr	47468 (6501) b	30456 (5955) b	2550 (575) b	3332 (712) c	424 (101) a	954 (67) c	1263 (708) a	1026 (283) b	262 (222) a	594 (80) b

Dados são a média de 7 amostras de folhas de Picual e uma de folhas de Arbequina analisadas em triplicata. O desvio padrão é mostrado entre parênteses. [y]Hy 4-glucoside, hidroxitirosol 4-glicosídeo; Hy 1-glucoside, hidroxitirosol 1-glucoside; outros é a soma de salidroside, rutina, luteolin-7-glucoside, comselogoside e cafeoil-6-secologanoside. Valores de coluna seguidos pela mesma letra não diferem ao nível de significância de 5% de acordo com o teste de múltiplas faixas de Duncan.
Fonte: Romero, 2017 - Traduzido pela autora

O efeito sinérgico a partir do consumo de OLE demonstra que alguns parâmetros podem se diferenciar quando comparados ao uso do composto bioativo oleuropeína isolado. Todavia, é essencial a compreensão da atividade da oleuropeína isoladamente para a partir destes resultados assimilar o efeito sistêmico do seu consumo crônico.

No estudo de Somerville (17) foi realizado um ensaio clínico duplo-cego randomizado controlado com atletas de 16 a 19 anos para avaliar o efeito da suplementação de OLE em doenças do trato respiratório superior (n=32). Os estudantes foram divididos entre suplementação com 20g de extrato de folha de oliveira (100mg de oleuropeína) ou placebo. Ao final de 9 semanas, não houve diferença significativa na incidência das doenças do trato respiratório superior. No entanto, o

grupo OLE (n=17) teve uma redução de 28% na duração da doença em comparação ao grupo controle (n=12).

A pesquisa de Javidanpour (18) comparou o efeito de exercícios físicos isolados ou associados a OLE no eletrocardiograma de quarenta e oito ratos machos (Sprague-Dawley). Os animais foram submetidos à administração oral de OLE (100, 200, 400mg/kg) durante quatorze dias e os resultados demostraram que o grupo de exercício ($p < 0,001$) e OLE (400 mg/kg, $p = 0,043$) isoladamente e associados ($p = 0,007$) reduziram a freqüência cardíaca e aumentaram a voltagem do QRS ($p = 0,003$, $p = 0,047$ e $p = 0,046$, respectivamente).

Já no trabalho de Lockyer (19) também foi realizado um estudo randomizado, duplo-cego, controlado, cruzado para investigar os efeitos de OLE na pressão arterial de homens pré-hipertensos (n=60). A administração foi realizada por via oral (136mg oleuropeina; 6 mg *hydroxytyrosol*) durante 6 semanas com 4 semanas de tempo de *washout*. Os resultados sugerem que o grupo que ingeriu OLE apresentou uma redução significativa em relação ao controle [(PAS diurna -3,95 ± 11,48 mmHg, $p = 0,027$); (PAS 24 h -3,33 ± 10,81 mmHg, $p = 0,045$); (PAD diurna -3,00 ± 8,54 mmHg, $p = 0,025$) e (PAD 24 h -2,42 ± 7,61 mmHg, $p = 0,039$)]. Também foram relatadas reduções no colesterol total no plasma (-0,32 ± DP 0,70 mmol / L, $p = 0,002$), no colesterol LDL (-0,19 ± 0,56 mmol / L, $p = 0,017$) e nos triglicerídeos (-0,18 ± 0,48, $p = 0,008$) - também induzidos por OLE em comparação com o grupo controle, enquanto que uma redução na interleucina-8 (-0,63 ± 1,13 pg / ml, $p = 0,026$) também foi relatada.

No estudo realizado por Filip (20), sessenta e quatro pacientes com osteopenia foram alocados randomicamente para receber 250 mg/dia de OLE mais 1000mg/dia de cálcio ou somente 1000mg de cálcio, que foi considerado o placebo. Ao final de 12 meses de estudo, os níveis do marcador pro-osteoblástico (osteocalcina) aumentaram significativamente ($p<0.05$) no grupo de tratamento em comparação ao controle.

Em relação à metabolização de OLE, de Bock (21) quantificou a biodisponibilidade e metabolismo da oleuropeína e hidroxitirosol quando consumidos como OLE. Para isso, nove voluntários (cinco homens) com idade de 42,8 ± 7,4 anos foram randomizados para receber ou cápsulas ou líquidos OLE como dose inferior (51,1 mg oleuropeína, 9,7 mg hidroxitirosol) ou superior (76,6 mg de oleuropeína, 14,5 mg de

hidroxitirosol) e, em seguida, o oposto (mas mesma formulação), após uma semana. Os resultados demonstram que os metabólitos conjugados do hidroxitirosol foram os principais metabólitos recuperados no plasma e na urina após a ingestão de OLE. Tendo em vista que as concentrações máximas de oleuropeína no plasma foram maiores após ingestão de preparações líquidas do que cápsulas (0,47 versus 2,74 ng / mL; p = 0,004), o estudo conclui que OLE fornece eficazmente metabólitos de oleuropeína e hidroxitirosol ao plasma em humanos.

Entretanto, para a compreensão de qual comportamento pode ser atribuído ao composto isolado da oleuropeína e não ao efeito sinérgico do consumo de OLE, mais estudos são necessários.

2.3 OLEUROPEÍNA

A oleuropeína é um dos principais compostos encontrado nas folhas de oliveira. Além do método de extração e do método de quantificação, a parte escolhida da planta é fundamental para determinar a quantidade de oleuropeína presente. No estudo de revisão de Barbaro (22) foi avaliada a quantidade de oleuropeína das diferentes partes da espécie vegetal e posteriormente os artigos que avaliaram seu efeito em desfechos ligados ao câncer.

Tabela 1 - Gama de conteúdo de oleuropeína em diferentes fontes

Fonte	Quantidade de oleuropeína	Referência
Folhas de oliveira	93 - 134 mg/g (DW)	(23)
	6,1 - 13,3 mg/g (DW)	(24)
	5,6 - 9,2 mg/g (DW)	(25)
	34 - 38,1 mg/g (FW)	(26)
	60 - 90 mg/g (DW)	(27)
	2,1–24,8 mg/g (DW)	(28)
Ramos de oliveira	11–14 g/kg (DW)	(29)
	18.9 g/kg (DW)	(30)
Raízes de oliveira	1.9–6.0 g/kg (DW)	(31)
Botões de oliveira	15.7–58.4 mg/g (FW)	(26)
Flores de oliveira	15.3–20.9 mg/g (FW)	(26)
Azeitonas	2.5–8.9 mg/g (FW)	(32)
	0.6–1.1 mg/g (DW)	(25)
	13.6–50.8 mg/g (FW)	(26)
	0.4–21.7 mg/g (DW)	(28)
	1.3–5.8 mg/g (FW)	(33)
	0.3–3.5 mg/g (FW)	(34)
Azeitonas de mesa	0.0–0.1 mg/g (DW)	(28)
	0.0–0.5 mg/g (FW)	(35)
Azeite virgem	0.0–11.2 mg/kg	(36)
	0.0–4.7 mg/kg	(37)
	2.0 mg/kg	(38)
	3.8 mg/kg	(39)
Bagaço de azeitona	0.4 mg/g (DW)	(40)

Fonte: Barbaro, 2014 – Traduzido pela autora

O valor da variação de concentração de oleuropeína entre a folhas, ramos, raiz, broto e flores possui uma grande variação, sendo a maior observada entre as folhas de oliveira, como pode ser observado na Tabela 1. Na Tabela 2 é possível verificar as

linhagens celulares e os tipos de câncer em que a oleuropeína foi testada para efeito antitumoral.

Tabela 2 - Efeitos antitumorais induzidos pela oleuropeína em diferentes linhagens celulares de câncer

Linhagem celular	Tipo de câncer	Referência
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	(41, 40)
MDA	Adenocarcinoma de mama	(43)
T-47D	Carcinoma Ductal In Situ	(41)
HT 29	Adenocarcinoma colorretal	(44)
Caco-2	Adenocarcinoma colorretal	(45)
LoVo	Adenocarcinoma colorretal	(41)
TF 1	Eritroleucemia	(41)
LN 18	Glioblastoma	(41)
A549	Carcinoma pulmonar	(46)
RPMI 7951	Melanoma	(41)
LNCaP e DU145	Câncer de próstata	(47)
786-O	Adenocarcinoma de células renais	(41)
T-24	Carcinoma Urotelial	(48)

Fonte: Barbaro, 2014 – Traduzido pela autora

No estudo realizado por Larussa (49) foi investigada a atividade da oleuropeína na colônia da mucosa de pacientes com colite ulcerativa (UC). Durante a colonoscopia de 14 pacientes com UC ativa foi realizada biópsia. A expressão de ciclooxigenase (COX) -2 e interleucina (IL) -17 foi avaliada em extratos protéicos totais de biópsias colônicas tratadas por Western blotting. A expressão de COX-2 e IL-17 foi significativamente menor nas amostras tratadas com oleuropeína + lipossacarídeo da Escherichia coli (EC-LPS) em comparação àquelas tratadas apenas com EC-LPS (0,80 ± 0,15 unidades arbitrárias (au) vs. 1,06 ± 0,19 au, p = 0,003 e 0,71 ± 0,08 au vs. 1,26 ±

0,42 au, p = 0,03, respectivamente) assim como os níveis de IL-17 em sobrenadantes de cultura de amostras tratadas com oleuropeína + EC-LPS (21,16 ± 8,64 pg/mL vs. 40,67 ± 9,24 pg/mL, p = 0,01). Histologicamente, as amostras tratadas com oleuropeína mostraram uma melhora do dano inflamatório com infiltração reduzida de células CD3, CD4 e CD20, enquanto o número de CD68 aumentou.

A pesquisa realizada por Przychodzen (50) investigou a eficiência anticancerígena da atividade da oleuropeína, quando usada separadamente e em combinação com o agente quimioterápico, 2-metoxiestradiol (2-ME) em células de osteossarcoma (OS) altamente metastáticas. Os efeitos anticancerígenos da oleuropeína foram significativamente aumentados após a adição de 2-ME. Já o tratamento da célula 143B OS com oleuropeína, isoladamente ou em combinação com 2-ME, resultou na indução de autofagia.

O efeito antimigratório da oleuropéina (OLEU) foi avaliado no estudo de Choupani (51) para detectar o efeito do composto no nível de expressão de marcadores EMT, em células MCF-7. O efeito citotóxico da oleuropeína e doxorrubicina foi avaliado pelo teste de MTT, enquanto a taxa de apoptose foi investigada por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a capacidade de migração das células MCF-7 diminuiu consideravelmente no grupo tratado com oleuropeína e os resultados da RT-PCR (tempo real) mostraram que a oleuropeína pode exercer sua ação antimigratória suprimindo a EMT através da regulação negativa da sirtuina1 (SIRT1). Além disso, os resultados indicaram que tanto a oleuropeína como o DOX eram citotóxicos para as células MCF-7, enquanto que o co-tratamento com DOX-OLEU levou à citotoxicidade aditiva e taxa de apoptose.

A administração de oleuropeína (12 mg/kg/day e 24mg/kg/day) em ratas Wistar (n=32) via gavagem avaliou os efeitos da oleuropeína na perda óssea alveolar induzida por ligadura. Os animais foram submetidos a 14 dias de aplicação com posterior avaliação de atividade osteoblástica, atividade osteoclástica, marcadores inflamatórios e apoptose. Os resultados do estudo sugerem que o grupo com periodontite apresentou maior perda óssea alveolar com níveis significativamente menores nos grupos de maior e menor dose de oleuropeína. Os grupos de oleuropeína 12 e 24 mg/kg aumentaram significativamente as contagens de células dos osteoblastos e diminuíram as contagens

de osteoclastos e de células inflamatórias TRAP-positivas. As expressões BMP - 4 e bcl - 2 foram elevadas nos grupos oleuropeína, enquanto as expressões caspase - 3 diminuíram ($p<0.05$). iNOS e CD68 foram maiores no grupo periodontite em comparação ao grupo controle, mas não houve diferença significativa entre os outros grupos (52).

Estudos referentes a pesquisas que relacionaram o efeito da oleuropeína e da folha de oliveira com doenças cardiovasculares em modelos experimentais foram sistematizados na revisão também apresentada nesta dissertação (CRD42019129083).

3. JUSTIFICATIVA

3.1 – Projeto 1

Avaliação da toxicidade subcrônica da farinha de folha de oliveira em ratas wistar

O consumo da oleuropeína, principal composto da farinha da folha de oliveira, provoca diversos impactos, dentre eles cardioprotetores e anticancerígenos. Explorar os efeitos benéficos do seu consumo também está atrelado à segurança alimentar. No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam a toxicidade deste insumo. Para que este novo produto possa ser oferecido em larga escala, além de estudos de eficácia, os estudos de segurança são de extrema importância.

3.2 – Projeto 2

Desenvolvimento de biscoitos adicionados de farinha de folha de oliveira e seu potencial para a saúde humana

A farinha da folha de oliveira ainda é pouco explorada no mercado quando comparada aos seus potenciais efeitos na promoção da saúde. O efeito antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno e cardioprotetor são alguns dos benefícios já indicados através da literatura científica. Por isso, essa pesquisa visa encorajar a utilização por completo de um produto que é produzido em larga escala, porém que valoriza apenas uma única parte do cultivo - a oliva. Mas que, além disso, possui uma grande quantidade de benefícios na promoção da saúde humana.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral – Projeto 1

Avaliação da toxicidade subcrônica da farinha de folha de oliveira em ratas Wistar

Avaliar a toxicidade *in vivo* da farinha das folhas de oliveira em ratas Wistar fêmeas.

4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Estimar a toxicidade por dose repetida da farinha de folha de oliveira através do ensaio de toxicidade subcrônica;

2 - Avaliar os parâmetros hematológicos;

3 - Avaliar os parâmetros bioquímicos;

4.2. Objetivo geral – Projeto 2

Desenvolvimento de biscoitos adicionados de farinha de folha de oliveira e seu potencial para a saúde humana

Desenvolver um produto elaborado a partir da farinha da folha de oliveira.

4.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1 - Elaborar uma formulação à base de farinha de folha de oliveira (*Olea europaea L*)

2 - Analisar físico-quimicamente o produto obtido a partir da farinha da folha de oliveira (*Olea europaea L*)

3 - Analisar sensorialmente o produto obtido a partir da farinha da folha de oliveira (*Olea europaea L*)

5. SISTEMÁTICA DE BUSCA DE REFERÊNCIAS DA LITERATURA

A sistemática de busca foi realizada nas bases de dados: Pubmed; Web of Science; e Scopus. Para cada uma das bases de dados, foi adotado o uso da busca mais sensível tendo em vista que para o MeSH (Medical Subject Headings) "*oleuropein"* poucos artigos resultaram da busca (n≅850). A partir disto, para realização da revisão sistemática e das demais buscas para realização deste trabalho, foi adotado primariamente a busca sensível ao invés da específica.

Para a busca no **Pubmed**, os resultados obtidos para a combinação de descritores relacionados ao tema foram os seguintes:
(oleuropein) - n=863
("olive leaf" OR "olive leaves") - n=523
("oleuropein") AND (("olive leaf" OR "olive leaves")) - n=185

Para buscas realizadas no **Scopus**, os resultados são:
(oleuropein) - n=1786
("olive leaf" OR "olive leaves") - n=1240
("oleuropein") AND (("olive leaf" OR "olive leaves")) - n = 376

Para a pesquisa realizada no **Web of Science** com os mesmos descritores:
(oleuropein) - n=1745
("olive leaf" OR "olive leaves") - n=1218
("oleuropein") AND (("olive leaf" OR "olive leaves")) - n = 432

O descritor "oleuropein aglycone" ainda que também esteja apontado no Pubmed como também um MeSH, quando adicionado às buscas, não altera o resultado. Nas bases de dados Scopus e Web of Science um grande número de artigos apontados são das áreas da química aplicada ou de engenharia química, resultando em número final de artigos compatíveis com os triados na revisão sistemática realizada e, posteriormente, nas buscas realizadas para execução deste trabalho.

Lista de Referências

1. Coutinho EF, Ribeiro FC, Cappellaro TH. Cultivo de oliveira (Olea europaea L.). Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção (INFOTECA-E). 2009.

2. Lavee S. World olive encyclopedia. International Olive Oil Council. 1996(1):61-106.

3. El SN, Karakaya S. Olive tree (Olea europaea) leaves: potential beneficial effects on human health. Nutrition reviews. 2009;67(11):632-8.

4. FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação). (2019), O Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Roma, FAO, parte I.

5. AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. [acesso em maio de 2019]. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.

6. Karantonis HC, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others. Journal of agricultural and food chemistry. 2002;50(5):1150-60.

7. Loffredo L, Perri L, Nocella C, Violi F. Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients: focus on extra virgin olive oil and cocoa. British journal of clinical pharmacology. 2017;83(1):96-102.

8. Calabriso N, Massaro M, Scoditti E, D'Amore S, Gnoni A, Pellegrino M, et al. Extra virgin olive oil rich in polyphenols modulates VEGF-induced angiogenic responses by preventing NADPH oxidase activity and expression. The Journal of nutritional biochemistry. 2016;28:19-29.

9. Yubero-Serrano EM, Lopez-Moreno J, Gomez-Delgado F, Lopez-Miranda J. Extra virgin olive oil: More than a healthy fat. European journal of clinical nutrition. 2018:1.

10. Rigakou A, Diamantakos P, Melliou E, Magiatis P. S-(E)-Elenolide: a new constituent of extra virgin olive oil. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019.

11. Vogel P, Kasper Machado I, Garavaglia J, Terezinha Zani V, de Souza D, Morelo Dal Bosco S. Polyphenols benefits of olive leaf (Olea europaea L) to human health. Nutrición hospitalaria. 2015;31(3).

12. Boss A, Bishop K, Marlow G, Barnett M, Ferguson L. Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. Nutrients. 2016;8(8):513.

13. Al-Quraishy S, Othman MS, Dkhil MA, Moneim AEA. Olive (Olea europaea) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;91:338-49.

14. Cumaoğlu A, Rackova L, Stefek M, Kartal M, Maechler P, Karasu Ç. Effects of olive leaf polyphenols against H_2O_2 toxicity in insulin secreting β-cells. Acta Biochimica Polonica. 2011;58(1).

15. Fennema OR. Química de los alimentos: Acribia; 1993.

16. Romero M, Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, et al. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. Food & function. 2016;7(1):584-93.

17. Somerville V, Moore R, Braakhuis A. The Effect of Olive Leaf Extract on Upper Respiratory Illness in High School Athletes: A Randomised Control Trial. Nutrients. 2019;11(2):358.

18. Javidanpour S, Dianat M, Aliakbari FR, Sarkaki A. The effects of olive leaf extract and 28 days forced treadmill exercise on electrocardiographic parameters in rats. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2018;23.

19. Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. European journal of nutrition. 2017;56(4):1421-32.

20. Filip R, Possemiers S, Heyerick A, Pinheiro I, Raszewski G, Davicco M-J, et al. Twelve-month consumption of a polyphenol extract from olive (Olea europaea) in a double blind, randomized trial increases serum total osteocalcin levels and improves serum lipid profiles in postmenopausal women with osteopenia. The journal of nutrition, health & aging. 2015;19(1):77-86.

21. De Bock M, Thorstensen EB, Derraik JG, Henderson HV, Hofman PL, Cutfield WS. Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (O lea europaea L.) leaf extract. Molecular nutrition & food research. 2013;57(11):2079-85.

22. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, et al. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. International Journal of Molecular Sciences. 2014;15(10):18508-24.

23. Savournin C, Baghdikian B, Elias R, Dargouth-Kesraoui F, Boukef K, Balansard G. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative

determination of oleuropein in Olea europaea leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001;49(2):618-21.

24. Ansari M, Kazemipour M, Fathi S. Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. Journal of the Iranian Chemical Society. 2011;8(1):38-47.

25. Tayoub G, Sulaiman H, Hassan AH, Alorfi M. Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. Int J Med Arom Plants. 2012;2(3):428-33.

26. Malik NS, Bradford JM. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina'olives. Scientia Horticulturae. 2006;110(3):274-8.

27. Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. Scientia pharmaceutica. 2010;78(2):133-54.

28. Charoenprasert S, Mitchell A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (Olea europaea). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012;60(29):7081-95.

29. Altinyay C, Altun M. HPLC analysis of oleuropein in Olea europaea L. J Fac Pharm. 2006;35(1):1-11.

30. Japón-Luján R, Luque de Castro M. Small branches of olive tree: a source of biophenols complementary to olive leaves. Journal of agricultural and food chemistry. 2007;55(11):4584-8.

31. Ortega-García F, Peragón J. HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and

tyrosol in stems and roots of Olea europaea L. cv. Picual during ripening. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2010;90(13):2295-300.

32. Malik NS, Bradford JM. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina'olives. Scientia Horticulturae. 2006;110(3):274-8.

33. Ranalli A, Contento S, Lucera L, Di Febo M, Marchegiani D, Di Fonzo V. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.). Journal of agricultural and food chemistry. 2006;54(2):434-40.

34. Bouaziz M, Jemai H, Khabou W, Sayadi S. Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2010;90(10):1750-8.

35. Esti M, Cinquanta L, La Notte E. Phenolic compounds in different olive varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998;46(1):32-5.

36. Zoidou E, Melliou E, Gikas E, Tsarbopoulos A, Magiatis P, Skaltsounis A-L. Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein. Journal of agricultural and food chemistry. 2009;58(1):46-50.

37. Perri E, Raffaelli A, Sindona G. Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ionspray mass spectrometry− selected reaction monitoring. Journal of agricultural and food chemistry. 1999;47(10):4156-60.

38. Caponio F, Alloggio V, Gomes T. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. Food Chemistry. 1999;64(2):203-9.

39. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and

health effects. The Journal of nutritional biochemistry. 2002;13(11):636-44.

40. Tuberoso CI, Kowalczyk A, Sarritzu E, Cabras P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. Food Chemistry. 2007;103(4):1494-501.
41. Kanakis P, Termentzi A, Michel T, Gikas E, Halabalaki M, Skaltsounis A-L. From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. Planta medica. 2013;79(16):1576-87.

42. Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. Biochemical and biophysical research communications. 2005;334(3):769-78.

43. Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. Cytotechnology. 2009;59(1):45-53.

44. Hassan ZK, Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, Al-Olayan EM, Elobeid MA, et al. Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention. 2012;13(9):4555-9.

45. Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Cortes-Delgado A, Alarcón de la Lastra C. Mechanisms involved in the antiproliferative and proapoptotic effects of unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil on HT-29 cancer cells. Nutrition and cancer. 2013;65(6):908-18.

46. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MA, Spencer JP. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. Biochemical and biophysical research communications. 2007;362(3):606-11.

47. Mao W, Shi H, Chen X, Yin Y, Yang T, Ge M, et al. Anti-proliferation and migration effects of oleuropein on human A549 lung carcinoma cells. Latin American Journal of Pharmacy. 2012;31(8):1217-21.

48. Acquaviva R, Di Giacomo C, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, et al. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. International journal of oncology. 2012;41(1):31-8.

49. Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, et al. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. Molecular nutrition & food research. 2009;53(5):600-8.

50. Larussa T, Oliverio M, Suraci E, Greco M, Placida R, Gervasi S, et al. Oleuropein decreases cyclooxygenase-2 and interleukin-17 expression and attenuates inflammatory damage in colonic samples from ulcerative colitis patients. Nutrients. 2017;9(4):391.

51. Przychodzen P, Wyszkowska R, Gorzynik-Debicka M, Kostrzewa T, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Anticancer Potential of Oleuropein, the Polyphenol of Olive Oil, With 2-Methoxyestradiol, Separately or in Combination, in Human Osteosarcoma Cells. Anticancer research. 2019;39(3):1243-51.

52. Choupani J, Alivand MR, M. Derakhshan S, Zaeifizadeh M, S. Khaniani M. Oleuropein inhibits migration ability through suppression of epithelial-mesenchymal transition and synergistically enhances doxorubicin-mediated apoptosis in MCF-7 cells. Journal of cellular physiology. 2019;234(6):9093-104.

53. Taskan MM, Balci Yuce H, Karatas O, Gevrek F, Toker H. Evaluation of the effect of oleuropein on alveolar bone loss, inflammation, and apoptosis in experimental

periodontitis. Journal of periodontal research. 2019.

6. PATENTE DE INVENÇÃO DA FARINHA DE FOLHA DE OLIVEIRA

No capítulo 6 da presente Dissertação de Mestrado é apresentado o Relatório de Invenção da Farinha de folha de oliveira. Dados referentes a coleta, processamento das folhas, preparo da farinha e dados físico-químicos são apresentados. Bem como outros dados relevantes exigidos pelo Relatório de Invenção de patentes. Tendo em vista que tal conteúdo é considerado sigiloso, não serão descritos na versão pública deste trabalho.

9. Artigo

Safety of olive leaves based in subchronic oral toxicity in Wistar rats

MENEZES, R. C. R.[1,4]; GARCIA, K. R.[2]; GARAVAGLIA, J.[1]; DAL BOSCO, S. M.[1]; DALLEGRAVE, E[3,4].

1. Graduate Program in Nutrition Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS
2. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS
3. Graduate Program in Health Sciences and Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS
4. Laboratory of Toxicology Research (LAPETOX), UFCSPA, Porto Alegre

Abstract: The olive trees (*Olea europaea L*) are known through the Mediterranean diet, mainly because they are the raw material of olive oil. Studies have shown an antioxidant potential of olive leaves, specially associate to it main component: oleuropein. Twenty female Wistar rats were alocated into four groups as following: control (n=5), 500mg/kg (n=5), 1000mg/kg (n=5) and 2000mg/kg (n=5). A fresh ricotta-based paste with olive leaf flour was offered daily until ensured completely consumption. Control group received fresh ricotta-based paste with conventional diet (CD). Hematological and biochemical parameters were assessed. Our data showed that rats treated with olive leaf flour had a reduction in body weight gain compared to control group ($p<0.001$). Hematological parameters had no significant difference, except for platelets, which were higher in 1000mg/kg and 2000mg/kg groups in contrast to control group ($p<0.001$) although the values are into the reference values for the species. The liver relative weight in the olive leaf flour treated groups was higher compared to control group (p=0,017), however no differences were observed in hepatic (AST, ALT and ALP), renal (urea and creatinine) and other markers (CK-NAC), neither lipid profile (TAG, TCHO, HLC-C and LDL-C) among groups. The olive leaf flour is rich in oleuropein and presents a nutraceutical potential for antioxidant and anti-inflammatory activies. The results has shown that olive leaf flour even at higher doses than usual for consumption still has a good safety profile.

Keywords: Olive leaf; oleuropein; safety; subchronic oral toxicity; rats.

1. Introduction

Olive trees (*Olea europea L)* are known through the Mediterranean diet, mainly to be the raw material of olive oil. The production of olive trees has been focused on the well-known recognized benefits of regular consumption of extra-virgin olive oils (Esquius, 2019, Loffredo, 2017 and Calabriso, 2016). Nevertheless, the olive tree substrates are underexploited compared to olive fruit. Olive leaf can be considered as a mixture between the leaves and branches that are usually discarded (Montedoro, 1993). The leaves have an antioxidant potential related to the present content of polyphenols (Vogel, 2015) .

The polyphenols present mainly in olive leaves were characterized as oleuropein and hydroxytyrosol (Benavente-García, 2000). The use of olive leaf and olive leaf extract (OLE) has been studied due to its possible result in cardioprotective, antioxidant, anti-inflammatory and immunological responses and already has been used in some countries as supplements (Ben-Salem, 2015).

Studies have shown an anti-carcinogenic potential of olive leaves, designing an alternative from the use of the olive leaf extract (Shamshoum, 2017). In addition, OLE showed to be a potent antioxidant against oxidative stress (Alizeraei, 2013). Other studies have shown an antioxidant and antimicrobial potential, suggesting that oleuropein can be used in the food industry as a food additive and nutraceutical compound (Sahin, 2017).

Despite there are studies evaluating the effects of oleuropein consumption, few experimental studies evaluate the systemic effect of the use of the extract (OLE) or even the isolated compound. The use of OLE presents itself as a viable, sustainable and possible health impact through food consumption.

In spite of the evidence, human studies evaluating olive leaf efficacy are still scarce, mainly for the absence of toxicity studies. Considering a screening study evaluating an acute toxicity potential of olive leaf flour with no signs of toxicity, a repeated dose trial were designed to investigate possible health risks that may arise from repeated exposure over a limited period of time. Subchronic studies (4 weeks) are

suitable considering the use of olive leaf flour for food consumption. The aim of this study was to assess safety based in subchronic toxicity of olive leaf flour in Wistar rats.

6. References

1. Alirezaei M, Dezfoulian O, Sookhtehzari A, Asadian P, Khoshdel Z. Antioxidant effects of oleuropein versus oxidative stress induced by ethanol in the rat intestine. Comparative Clinical Pathology. 2014;23(5):1359-65.

2. American Institute of Nutrition (AIN), AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76-A rodent diet. J Nutr 1993;123:1939-51.

3. Anderson JW, Baird P, Davis Jr RH, Ferreri S, Knudtson M,Koraym A, Waters V, Williams CL. Health benefits of dietary fiber. Nutr Rev 2009; 67: 188-205.
4.
5. Ben Salem M, Affes H, Ksouda K, Sahnoun Z, Zeghal KM, Hammami S. Pharmacological Activities of O lea europaea Leaves. Journal of food processing and preservation. 2015;39(6):3128-36.

6. Benavente-Garcıa O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio J. Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. Food chemistry. 2000;68(4):457-62.

7. Bouten J, Caen K, Stautemas J, Lefevere F, Derave W, Lootens L, et al. Eight weeks of static apnea training increases spleen volume but not acute spleen contraction. Respiratory physiology & neurobiology. 2019.

8. Calabriso N, Massaro M, Scoditti E, D'Amore S, Gnoni A, Pellegrino M, et al. Extra virgin olive oil rich in polyphenols modulates VEGF-induced angiogenic responses by preventing NADPH oxidase activity and expression. The Journal of nutritional biochemistry. 2016;28:19-29.

9. Coelho EM, de Azevêdo LC, Viana AC, Ramos IG, Gomes RG, Lima MdS, et al. Physico-chemical properties, rheology and degree of esterification of passion fruit

(Passiflora edulis f. flavicarpa) peel flour. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2018;98(1):166-73.

10. Corrêa E, Medina L, Barros-Monteiro J, Valle N, Sales R, Magalães A, et al. The intake of fiber mesocarp passionfruit (Passiflora edulis) lowers levels of triglyceride and cholesterol decreasing principally insulin and leptin. The journal of aging research & clinical practice. 2014;3(1):31.

11. Esquius L, Garcia-Retortillo S, Balagué N, Hristovski R, Javierre C. Physiological- and performance-related effects of acute olive oil supplementation at moderate exercise intensity. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 2019;16(1):12.

12. Hadrich, F., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Feki, I., Isoda, H., Feve, B., & Sayadi, S. (2016). Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. Chemico-Biological Interactions, 252, 54–60. doi:10.1016/j.cbi.2016.03.026

13. Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W, Van de Wiele T.Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. Nutr Rev 2011; 69: 245-58.

14. Iyenagbe DO, Malomo SA, Idowu AO, Badejo AA, Fagbemi TN. Effects of thermal processing on the nutritional and functional properties of defatted conophor nut (Tetracarpidium conophorum) flour and protein isolates. Food science & nutrition. 2017;5(6):1170-8.

15. Kestwal RM, Bagal-Kestwal D, Chiang B-H. Analysis and enhancement of nutritional and antioxidant properties of Vigna aconitifolia sprouts. Plant foods for human nutrition. 2012;67(2):136-41.

16. Kuem N, Song SJ, Yu R, Yun JW, Park T. Oleuropein attenuates visceral

adiposity in high-fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b-and galanin-mediated signalings. Molecular nutrition & food research. 2014;58(11):2166-76.

17. Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. European journal of nutrition. 2017;56(4):1421-32.

18. Loffredo L, Perri L, Nocella C, Violi F. Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients: focus on extra virgin olive oil and cocoa. British journal of clinical pharmacology. 2017;83(1):96-102.

19. Medhe S, Jain S, Anal AK. Effects of sprouting and cooking processes on physicochemical and functional properties of moth bean (Vigna aconitifolia) seed and flour. Journal of Food Science and Technology.1-11.

20. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Miniati E, Macchioni A. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1993;41(11):2228-34.

21. OECD-Organisation for Economic Co-operation and Development, 2010 OECD-Organisation for Economic Co-operation and Development Guid. Doc. Assess. Chem. Endocr. Disrupt., 9 (2010), pp. 260-277.

22. Oliveira PS, Saccon TD, Da Silva TM, Costa MZ, Dutra FS, de Vasconcelos A, et al. Green juice as a protector against reactive species in rats. Nutricion hospitalaria. 2013;28(5).

23. Park S, Choi Y, Um S-J, Yoon SK, Park T. Oleuropein attenuates hepatic

steatosis induced by high-fat diet in mice. Journal of hepatology. 2011;54(5):984-93.

24. Şahin S, Samli R, Tan ASB, Barba FJ, Chemat F, Cravotto G, et al. Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. Molecules. 2017;22(7):1056.

25. Shamshoum H, Vlavcheski F, Tsiani E. Anticancer effects of oleuropein. Biofactors. 2017;43(4):517-28.

26. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory.USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy. Version Current: June 2019.

27. van der Stelt I, Hoek-van den Hil EF, Swarts HJ, Vervoort JJ, Hoving L, Skaltsounis L, et al. Nutraceutical oleuropein supplementation prevents high fat diet-induced adiposity in mice. Journal of functional foods. 2015;14:702-15.

28. Vogel P, Kasper Machado I, Garavaglia J, Terezinha Zani V, de Souza D, Morelo Dal Bosco S. Polyphenols benefits of olive leaf (Olea europaea L) to human health. Nutrición hospitalaria. 2015;31(3).

10. PATENTE DE INVENÇÃO DE COOKIES DE FARINHA DE FOLHA DE OLIVEIRA

O Capítulo 10 desta Dissertação de Mestrado é referente ao Relatório de Invenção dos *Cookies* de farinha de folha de oliveira. Assim como o Capítulo 6, é apresentado o conteúdo referente a elaboração dos cookies, análise físico-química e análise sensorial. Outros dados relevantes exigidos pelo Relatório de Invenção de Patentes também são apresentados neste capítulo. Considerando o teor sigiloso atrelado a este conteúdo também não serão descritos na sua versão pública.

10. CONSIDERAÇOES FINAIS

No ensaio de toxicidade subcrônico realizado com ratas Wistar não foram apresentados sinais de toxicidade após o consumo de *pellets* de farinha de folha de oliveira. Não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos, com exceção do maior número de plaquetas nos grupos tratados ($p<0.001$), o que está em conformidade com a perda de massa relativa do baço nos mesmos animais ($p<0.05$). Quanto aos parâmetros bioquímicos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A redução no ganho de peso relativo nos grupos que consumiram farinha de folha de oliveira ($p<0.001$) corroboram os achados da literatura. A perda de massa relativa do fígado isoladamente não configura um sinal de toxicidade tendo em vista a não alteração dos marcadores hepáticos (AST, ALT E ALP). Entretanto, as análises histológicas ainda irão fornecer dados mais consistentes quanto a esse achado.

Paralela à avaliação de toxicidade subcrônica, o desenvolvimento de *cookies* adicionados de farinha de folha obteve um bom perfil de sabor em concordância ao padrão alimentar usual. O resultado da análise físico-química revelou que após o forneamento a oleuropeína ainda se mantinha presente no produto, estando em concentrações maiores de acordo com a progressão da farinha de folha de oliveira nas amostras. Na análise sensorial (ADQ) aplicada os painelistas treinados não observaram diferença entre as amostras nos quesitos avaliados (sabor doce, sabor amargo, sabor ácido, crocância e retrogosto agradável), exceto aroma herbáceo e maciez. A percepção do aroma proeminentemente herbáceo nas amostras com percentual maior de farinha de folha de oliveira não impactou nos outros atributos avaliados.

A partir dos resultados obtidos nos projetos, a continuidade dos estudos acerca da segurança e da aplicabilidade da farinha de folha de oliveira são indispensáveis para dados mais sólidos. Por isso, as pesquisas de avaliação crônica do consumo de farinha de folha de oliveira em modelos experimentais ainda precisam ser realizadas para melhor compreensão dos dados obtidos nesta primeira avaliação. Além disso, a busca pela administração oral da farinha de forma pura apresenta-se como uma barreira a ser superada. É válido ressaltar que a administração oral via gavagem foi considerada, não

sendo possível em virtude do alto teor de fibra da farinha, ainda que em volumes maiores do que o habitual.

O uso de modelos experimentais para avaliação da toxicidade antes da realização de ensaios clínicos com população humana para avaliação dos efeitos do consumo é essencial para certificar a segurança referente ao produto. Logo, ainda que existam extratos de farinha de folha de oliveira sendo comercializado em outros países, a comercialização a partir da espécie vegetal oriunda do solo brasileiro não possui a mesma característica dos já vendidos. Ademais, a toxicidade relativa a oleuropeína ainda possui dados muito incipientes que precisam ser investigados com mais aprofundamento. Atrelado ao desenvolvimento de novos produtos que são potenciais insumos para aprimoramento nutracêutico de receitas, a segurança toxicológica deve ser considerada vital na sua estruturação.

O uso da farinha de folha de oliveira em receitas ainda que se apresente de forma desafiadora, pode ter seus aspectos mais severos superados. A associação de notas e aromas específicos suavizam seu atributo de amargor marcante, trazendo ao produto um grau herbal que o valoriza. Outras formulações com farinha de folha de oliveira devem continuar sendo aprimoradas para uma maior disponibilidade de produtos quando estes puderem ser ofertados para o consumo humano.

A responsabilidade científica do desenvolvimento de produtos deve estar associada não só ao potencial positivo, que por ventura venha a possuir, mas, sobretudo a segurança alimentar. Os achados desta dissertação indicam que há um potencial uso alimentar com apelo comercial da farinha de folha de oliveira associado a um baixo risco de toxicidade, embora mais estudos de segurança ainda precisem ser realizados.

11. ARTIGO DE REVISÃO

Association between olive leaf oleuropein and cardiovascular diseases: a systematic review

Rafaella Menezes[1,3] . Kathleen Kruger[1] . Marina Tuerlinckx Costa Valle[2,3] . Larissa Faccioli[1] . Eliane Dallegrave[2,3]. Juliano Garavaglia[1]. Simone Morelo Dal Bosco[1]

1. Graduate Program in Nutrition Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS
2. Graduate Program in Health Sciences and Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS
3. Laboratory of Toxicology Research (LAPETOX), UFCSPA, Porto Alegre

ABSTRACT

Evidence for the association between oleuropein and cardioprotective effects are not consolidated. Therefore, we aimed to evaluate the cardioprotective effect of oleuropein in animal experimentation. The literature search was conducted in July 2018 in the Pubmed, Scopus and Web of Science databases. The descriptors "oleuropein" and "oleuropein aglycone" and resulted in 23 articles for qualitative synthesis. Risk of bias was assessed by adapted SYRCLE's tool. The results demonstrate evidence of a positive association between the administration of oleuropein and outcomes related to the improvement of arterial hypertension, heart failure, acute myocardial infarction, renal hypertension and diabetes, arrhythmia, as well as cardioprotective effect.

KEYWORDS: Oleuropein; olive leaf; systematic review; cardiovascular diseases

INTRODUCTION

Olive tree (*Olea europea L)* is a vegetal used for olive production. It consists in underexplored branches and leaves rich in polyphenols that confer benefits to human health (1). The olive fruit production around the world has focused on the recognized benefits of regular consumption of extra virgin olive oil (2, 3, 4).

The polyphenols present in olive leaves are oleuropein and hydroxytyrosol and olive leaf extract (OLE) has already been used in some countries (5). Sustainability in

the use of leaves is due to the use of the substrate normally discarded in the productions, as well as the effects conferred by the use of the olive leaf extract (6). The oleuropein use has shown a cardioprotective, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effects (7).

Although there are studies evaluating the effects of oleuropein consumption, few experimental studies evaluate the systemic effect of the use of the extract (OLE) or even of the isolated compound. The evaluation of in vivo outcomes allows an understanding of the oleuropein, behavior but does not reach a more extensive view in organism action. The use of OLE presents a viable, sustainable and possible health impact through food consumption.

According to data from the World Health Organization (WHO), 17.9 million people die annually from cardiovascular diseases, which represents 31% of deaths. Different risk factors have already been related to cardiovascular diseases, including hypertension, type 2 diabetes, dyslipidemias and obesity (8, 9). The possible cardioprotective effect of oleuropein has been studied, most under animal experimentation, with few data in humans. The objective of this study was to realize a systematic review about the studies that evaluated the cardioprotective effect of oleuropein in animal experimentation.

References

1. Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Miniati E, Macchioni A. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1993;41(11):2228-34.

2. Esquius L, Garcia-Retortillo S, Balagué N, Hristovski R, Javierre C. Physiological- and performance-related effects of acute olive oil supplementation at moderate exercise intensity. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 2019;16(1):12.

3. Loffredo L, Perri L, Nocella C, Violi F. Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients: focus on extra virgin olive oil and cocoa. British journal of clinical pharmacology. 2017;83(1):96-102.

4. Calabriso N, Massaro M, Scoditti E, D'Amore S, Gnoni A, Pellegrino M, et al. Extra virgin olive oil rich in polyphenols modulates VEGF-induced angiogenic responses by preventing NADPH oxidase activity and expression. The Journal of nutritional biochemistry. 2016;28:19-29.

5. Benavente-Garcıa O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, Del Rio J. Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. Food chemistry. 2000;68(4):457-62.

6. Şahin S, Samli R, Tan ASB, Barba FJ, Chemat F, Cravotto G, et al. Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. Molecules. 2017;22(7):1056.

7. Shamshoum H, Vlavcheski F, Tsiani E. Anticancer effects of oleuropein. Biofactors. 2017;43(4):517-28.

8. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, et al. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. Jama. 2003;290(7):891-7.

9. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. The lancet. 2004;364(9438):937-52.

10. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. Journal of molecular and cellular cardiology. 2007;42(3):549-58.

11. Romero M, Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, et al. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. Food & function. 2016;7(1):584-93.

12. Esmailidehaj M, Bajoovand S, Rezvani ME, Sherifidehaj M, Hafezimoghadam Z, Hafizibarjin Z. Effect of oleuropein on myocardial dysfunction and oxidative stress induced by ischemic-reperfusion injury in isolated rat heart. Journal of Ayurveda and integrative medicine. 2016;7(4):224-30.

13. Lapi D, Di Maro M, Mastantuono T, Battiloro L, Sabatino L, Muscariello E, et al. Effects of oleuropein and pinoresinol on microvascular damage induced by hypoperfusion and reperfusion in rat pial circulation. Microcirculation. 2015;22(1):79-90.

14. Nekooeian AA, Khalili A, Khosravi MB. Effects of oleuropein in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: a study of antihypertensive mechanisms. Journal of Asian natural products research. 2014;16(9):953-62.

15. Hadrich F, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Feki I, Isoda H, Feve B, et al. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. Chemico-biological interactions. 2016;252:54-60.

16. Ivanov M, Vajic U-J, Mihailovic-Stanojevic N, Miloradovic Z, Jovovic D, Grujic-Milanovic J, et al. Highly potent antioxidant Olea europaea L. leaf extract affects carotid and renal haemodynamics in experimental hypertension: the role of oleuropein. EXCLI journal. 2018;17:29.

17. van der Stelt I, Hoek-van den Hil EF, Swarts HJ, Vervoort JJ, Hoving L, Skaltsounis L, et al. Nutraceutical oleuropein supplementation prevents high fat diet-induced adiposity in mice. Journal of functional foods. 2015;14:702-15.

18. Park S, Choi Y, Um S-J, Yoon SK, Park T. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. Journal of hepatology. 2011;54(5):984-93.

19. Janahmadi Z, Nekooeian AA, Moaref AR, Emamghoreishi M. Oleuropein attenuates the progression of heart failure in rats by antioxidant and antiinflammatory effects. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2017;390(3):245-52.

20. Kuem N, Song SJ, Yu R, Yun JW, Park T. Oleuropein attenuates visceral adiposity in high-fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b-and galanin-mediated signalings. Molecular nutrition & food research. 2014;58(11):2166-76.

21. Nekooeian AA, Khalili A, Khosravi MB. Effects of oleuropein in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: a study of antihypertensive mechanisms. Journal of Asian natural products research. 2014;16(9):953-62.

22. Khalili A, Nekooeian AA, Khosravi MB. Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. Journal of Asian natural products research. 2017;19(10):1011-21.

23. Sun W, Wang X, Hou C, Yang L, Li H, Guo J, et al. Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. Neuropharmacology. 2017;113:556-66.

24. Janahmadi Z, Nekooeian AA, Moaref AR, Emamghoreishi M. Oleuropein offers cardioprotection in rats with acute myocardial infarction. Cardiovascular toxicology. 2015;15(1):61-8.

25. Ruíz-Gutiérrez V, Muriana FJ, Maestro R, Graciani E. Oleuropein on lipid and fatty acid composition of rat heart. Nutrition Research. 1995;15(1):37-51.

26. Zhang J-Y, Yang Z, Fang K, Shi Z-L, Ren D-H, Sun J. Oleuropein prevents the development of experimental autoimmune myocarditis in rats. International immunopharmacology. 2017;48:187-95.

27. Olmez E, Vural K, Gok S, Ozturk Z, Kayalar H, Ayhan S, et al. Olive leaf extract improves the atherogenic lipid profile in rats Fed a high cholesterol diet. Phytotherapy Research. 2015;29(10):1652-7.

28. Mnafgui K, Khlif I, Hajji R, Derbali F, Kraiem F, Ellefi H, et al. Preventive effects of oleuropein against cardiac remodeling after myocardial infarction in Wistar rat through inhibiting angiotensin-converting enzyme activity. Toxicology mechanisms and methods. 2015;25(7):538-46.

29. Esmailidehaj M, Rasulian B, Rezvani ME, Delfan B, Mosaddeghmehrjardi MH, Pourkhalili K. The anti-infarct, antistunning and antiarrhythmic effects of oleuropein in isolated rat heart. EXCLI journal. 2012;11:150.

30. Baharvand B, Esmailidehaj M, Alihosaini J, Bajoovand S, Esmailidehaj S, Hafizibarjin Z. Prophylactic and therapeutic effects of oleuropein on reperfusion-induced arrhythmia in anesthetized rat. Iranian biomedical journal. 2016;20(1):41.

31. Xu Y, Wu L, Chen A, Xu C, Feng Q. Protective effects of olive leaf extract on acrolein-exacerbated myocardial infarction via an endoplasmic reticulum stress pathway. International journal of molecular sciences. 2018;19(2):493.

32. Esmailidehaj M, Mirhosseini S-J, Rezvani ME, Rasoulian B, Mosaddeghmehrjardi MH, Haghshenas D. Prolonged oral administration of oleuropein might protect heart against aconitine-induced arrhythmia. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2012;11(4):1255.

33. Lockyer S, Rowland I, Spencer JPE, Yaqoob P, Stonehouse W. Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. European journal of nutrition. 2017;56(4):1421-32.

34. Andreadou I, Mikros E, Ioannidis K, Sigala F, Naka K, Kostidis S, et al. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. Journal of molecular and cellular cardiology. 2014;69:4-16.

12. Anexos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
FACULDADE DE GASTRONOMIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos o(a) Sr(a) para participar da Pesquisa **DESENVOLVIMENTO DE BISCOITOS ADICIONADOS DE FARINHA DE FOLHA DE OLIVEIRA E SEU POTENCIAL PARA A SAÚDE HUMANA**, sob a responsabilidade da pesquisadora RAFAELLA CÂMARA ROCHA MENEZES, da pós-graduação em Ciências da Nutrição, sob supervisão e orientação da prof. Dr[a]. Simone Morelo Dal Bosco. O presente trabalho tem como objetivo avaliar as características sensoriais de biscoitos desenvolvidos a partir da adição da farinha da folha de oliveira. A sua participação é voluntária e se dará por meio de participar do painel de avaliadores sensoriais analisando as amostras de biscoitos adicionados de folha de oliveira, avaliando-as de acordo com o questionário que será entregue. As amostras serão codificadas e o Sr (a) também receberá um copo com água para limpeza bucal entre as análises. Se o Sr (a) aceitar participar, estará contribuindo para a ampliação do conhecimento na área de alimentos e do estudo em desenvolvimento de produtos. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os riscos mínimos envolvidos em participar deste projeto incluem alergia a algum dos ingredientes da formulação e intoxicação alimentar pela contaminação de algum dos insumos manipulados. Os ingredientes envolvidos na formulação são: farinha de trigo, farinha de folha de oliveira, açúcar refinado, leite, manteiga, fermento e essência de baunilha. Caso algum outro insumo tenha sido utilizado, você será informado e poderá se retirar a qualquer momento que desejar. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Caso haja qualquer indisposição física,

ou até mesmo uma intoxicação alimentar, decorrente dos insumos manipulados e da amostra fornecida, as pesquisadoras se responsabilizarão pelo devido encaminhamento médico e pelas despesas decorrentes dos cuidados de saúde. Para qualquer outra informação, o(a) Sr(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço Sarmento Leite, 245, pelo telefone (51) 3303-8743, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFCSPA, na Rua Sarmento Leite, 245, telefone (51) 3303-8804. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo uma das vias a do pesquisador responsável e a outra será fornecida ao Sr (a).

Consentimento Pós–Informação

Eu,_____,

fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

_____ Data: ___/ ____/ _____

Assinatura do Participante/responsável

_____

Assinatura do Pesquisador Responsável