Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos
da uva em hamsters**

Emília Yasuko Ishimoto

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde Pública para
obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição
Orientadora: Prof. Dr. Elizabeth A.F.S.Torres

São Paulo
2008

Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters

Emília Yasuko Ishimoto

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde Pública da Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição

Orientadora: Prof. Dr. Elizabeth A.F.S.Torres

**São Paulo
2008**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura: _____

Data: 04 de abril de 2008.

DEDICATÓRIA

À minha irmã Sueli e ao meu pai Seitaro, *in memoriam*.

Ao Marcel, por 16 anos de amor e companheirismo.

À minha mãe, por ser meu melhor exemplo
de força, coragem e perseverança.

*Aprende de los audaces
de los fuertes
de quien no acepta situaciones
de quien sobrevivirá apesar de todo...*

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, por acreditar em meu potencial desde o início do nosso relacionamento, pela confiança, paciência e compreensão diante de meus “altos e baixos”;

Aos Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, Prof^a Dr^a Maria Elisabeth Machado Pinto e Silva e Prof. Dr. Raul dos Santos Filho, pela enorme contribuição na fase de pré-banca. Estas contribuições foram extremamente valiosas para a qualidade da tese;

À Prof^a. Dr^a Déborah H. M. Bastos, pelas sugestões e auxílio durante e após a fase de qualificação do projeto, e por ter me ajudado a solucionar diversas dúvidas, sempre com boa vontade e muita competência;

À Prof^a Dr^a Lígia Muradian, pelas importantes sugestões fornecidas no exame de qualificação;

Ao Prof. Titular José Alfredo G. Arêas, pela permissão do uso do laboratório de Propriedades Funcionais;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudo concedida;

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa;

Ao querido amigo e grande mestre Sílvio Vicente, pela enorme ajuda durante a fase analítica, pelo apoio e amizade até nos momentos difíceis desta jornada;

À querida amiga Andréa Guerra Matias, pela grande ajuda durante as análises e pelos seus divertidos, alguns impagáveis, “Lab Hits”!...

À “super” Vanessa Capriles, outra parceira importante, pelo auxílio na condução da análise sensorial;

A Rosana A. M. Soares e Simone Mendonça, pela competência, alegria e constante disposição em prestar ajuda sempre que necessário;

A Geni R. Sampaio e Yara S. Queiróz, pela amizade, confiança, coleguismo e ótimo convívio de laboratório;

Ao José Pereira, por me socorrer sempre que precisei, desde o mestrado;

A Liânia, Marcela, LÍlian, Daniela, Ruth, Malu, Michele, Guilherme, Carol, Júlia e todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica - dos dois laboratórios - com quem tive o prazer de conviver. Pelo alegre convívio e lembranças de momentos “antológicos” que levo comigo com muito carinho, e já com saudades;

Ao Prof. Jorge Mancini, coordenador do Laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, por deixar sempre as “portas abertas” para o contato com seus alunos, o que me proporcionou um grande aprendizado;

A Elma R. S. Andrade-Wartha, Ana Mara O. e Silva e Alessandro de Lima, alunos do Laboratório de Lípidos da FCF/USP, pelo coleguismo e relevantes orientações referentes aos métodos analíticos;

A Clara Satsuki Mori, do Depto de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, por me ajudar, com simpatia e desprendimento, na interpretação dos dados analíticos das enzimas antioxidantes;

A Prof^a Dr^a Irene da Silva Soares, por autorizar a realização de análises no Laboratório de Análises Clínicas da FCF/USP, e aos técnicos Renata C.A.Marum e especialmente Maurício dos Santos pelo grande auxílio prestado durante as análises;

Ao engenheiro Gladistone da Superbom e Álvaro da Vinícola Miolo, pela gentileza em fornecer as matérias-primas deste estudo;

Aos grandes parceiros desta jornada: Sr. Aldo Baccarin (Food Intelligence), Dra. Edna Nakandacare (Fac.Medicina/USP), Prof. André Souto (PUC-RGS), Dr. Rodrigo Catharino (UNICAMP), Luis Roberto e Dra. Hiro Goto (Instituto de Medicina Tropical-USP). Que estas parcerias sejam frutíferas e duradouras;

À Valéria Sutti Nunes e Fabiana Dias Ferreira, do Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da USP, pela simpatia, boa vontade, paciência e competência em todos os momentos que precisei de auxílio;

Ao Rodrigo T. Iborra, pelo auxílio prestado na análise de oxidação do colesterol LDL;

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Saúde Pública/USP, pela eficiência, profissionalismo e esforço nos serviços prestados;

À Ângela, Vânia e Renilda, da Comissão de Pós-Graduação da FSP/USP, pela colaboração e pelo modo educado como sempre me atenderam;

Às secretárias do Depto Nutrição, especialmente Elisabeth Santos, pela eficiência e boa vontade nos serviços prestados, desde o mestrado;

Ao biólogo Robison Cruz, pelo modo didático, competente e profissional com que conduziu os experimentos biológicos;

Ao Jairo, representante da RANDOX, pelo pronto atendimento aos vários “pedidos de socorro” durante a fase de análises laboratoriais;

À minha grande amiga, “quase irmã” Laura, por tantos anos de amizade, pelo apoio constante e fundamental, principalmente nos momentos difíceis da minha vida;

Aos meus queridos amigos Lísia, Cláudia e Carlos Ferrari, pelo suporte, amizade e confiança;

À minha família, especialmente aos meus irmãos Kiyoko e Masao, querida sobrinha Katherine, tia Kinuyo e minha querida sogra Dna. Ruth, pela torcida e presença constante;

... e aos pesquisadores e acadêmicos com os quais tive o privilégio de “trocar figurinhas” ao longo dos últimos sete anos; foi sem dúvida uma rica experiência.

A todos vocês: muito, muito obrigada!!!

RESUMO

Ishimoto, E.Y. **Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters**. 2008. XXp. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Introdução: Recentes pesquisas têm indicado o enorme potencial de certas substâncias alimentares, como polifenóis antioxidantes e fibras na redução de riscos de doenças crônicas. O bagaço de uva, subproduto do processamento de vinhos e sucos, representa uma ótima fonte de fibras e antioxidantes naturais de baixo custo.

Objetivo: Avaliar o potencial hipolipemiante, antioxidante e sensorial de subprodutos do processamento do vinho e do suco. **Métodos:** Para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, foi utilizado o método do DPPH. O potencial antioxidante e hipolipemiante *in vivo* foi avaliado mediante ensaio biológico, no qual sessenta hamsters foram divididos em seis grupos diferenciados pelas dietas: controle, hiperlipemiante, extrato de bagaço do vinho (BV), extrato de bagaço do suco (BS), suplementada com BV e suplementada com BS. Amostras de sangue e fígado foram coletadas após 4 semanas de experimento para avaliação do perfil lipídico, capacidade de inibição da oxidação de LDL-colesterol (LDL-c) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Para a avaliação sensorial, foram desenvolvidos *sorbet* e *picolé* de BV e BS, cujos atributos sensoriais foram avaliados por 43 pessoas aplicando-se o método afetivo de escala hedônica de 9 pontos. **Resultados:** Extratos de BV e BS apresentaram uma expressiva capacidade antioxidante *in vitro*. No modelo animal, os grupos tratados com BV e BS apresentaram uma melhora significativa do perfil lipídico e da atividade da enzima CAT, em relação aos grupos controle e hipercolesterolêmico ($p < 0,05$). Com relação aos valores de SOD, GPx e inibição da oxidação de LDL-c, observou-se melhores resultados em relação ao grupo hipercolesterolêmico, embora não significativamente em todos os grupos tratados. Na análise sensorial, somente o *picolé* de BV não preencheu totalmente os requisitos de aceitação. **Conclusão:** Os subprodutos de ambas as espécies de uva apresentaram potencial biológico e sensorial para serem utilizados como ingredientes funcionais.

Palavras-chave: radicais livres, antioxidantes, hipolipemiante, uva, subprodutos.

ABSTRACT

Ishimoto, E.Y. **Hypolipidemic and antioxidant effects of grape processing byproducts in hamsters.** São Paulo (BR); 2008. (PhD Thesis – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Brazil).

Introduction: Recent studies have shown the great potential of certain food components such as antioxidant polyphenols and fiber in reducing the risk of chronic diseases. Grape pomace, a wine and juice processing byproduct, is a low cost material and a very good source of fiber and natural antioxidants. **Objectives:** To evaluate the hypolipidemic, antioxidant and sensory potential of wine and grape byproducts. **Methods:** To evaluate the *in vitro* antioxidant capacity, the DPPH method was used. The *in vivo* antioxidant and hypolipidemic potential was evaluated through an animal model, in which sixty hamsters were divided into six groups according to their diets: control, hyperlipidemic, wine pomace (WP) extract, juice pomace (JP) extract, WP supplemented diet and JP supplemented diet. Samples of blood and liver were collected after a 4-week experimental period to evaluate the lipid profile, ability to inhibit the LDL-cholesterol (LDL-c) oxidation and antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes. For the sensory evaluation, BV and BS *sorbet* and popsicle were developed, and the sensory attributes were evaluated by 43 tasters according to a 9-point affective hedonic scale. **Results:** WP and JP extracts showed a very good *in vitro* antioxidant capacity. In the animal model, both WP and JP treated groups presented a significant improvement in the lipid profile and CAT enzyme antioxidant activity in comparison to hypercholesterolemic and control groups ($p < 0.05$). Regarding the values of SOD, GPx and inhibition of LDL-c oxidation, there values were better when compared to hypercholesterolemic group, even though they were not significant in all treated groups. In the sensory evaluation, only the BV popsicle was not fully accepted. **Conclusion:** Both grapes byproducts showed a biological and sensory potential to be used as functional ingredients.

Key words : free radicals, antioxidants, hypolipidemic, grape, byproducts.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 Estresse Oxidativo.....	27
2.1.1 Oxidação Lipídica.....	29
2.2 Doenças Cardiovasculares.....	30
2.2.1 Aterosclerose.....	30
2.3 Defesa Antioxidante.....	32
2.3.1 Antioxidantes Endógenos.....	34
2.3.1.1 Superóxido Dismutase.....	35
2.3.1.2 Catalase.....	35
2.3.1.3 Glutathione Peroxidase.....	35
2.3.2 Antioxidantes em Alimentos.....	37
2.3.2.1 Compostos Fenólicos.....	38
2.4 Uva.....	42
2.4.1 Subprodutos da Uva.....	45
2.4.1.1 Compostos Bioativos do Bagaço de Uva.....	46
2.5 Modelos Experimentais de Hiperlipidemia em Animais.....	49
3. JUSTIFICATIVA.....	51
4. OBJETIVOS.....	53
4.1 Objetivo Geral.....	54
4.2 Objetivos Específicos.....	54
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
5.1 Bagaço de uvas.....	56
5.1.1 Bagaço de uva do vinho (BV).....	
5.1.2 Bagaço de uva do suco (BS).....	
5.2 Processamento das amostras.....	58
5.2.1 Obtenção da farinha.....	58
5.2.2 Desengorduramento da farinha.....	59
5.3 Caracterização nutricional das farinhas de bagaço de uva.....	60
5.3.1 Composição centesimal.....	60

5.3.2	Determinação de fibras.....	61
5.3.3	Determinação de ácidos graxos.....	62
5.3.4	Determinação de compostos fenólicos.....	63
5.3.4.1	Fenólicos totais.....	63
5.3.4.2	Interferência do ácido ascórbico.....	63
5.3.4.3	Resveratrol.....	64
5.4	Obtenção e avaliação dos extratos para o experimento biológico.....	65
5.4.1	Obtenção dos extratos.....	65
5.4.2	Teor de sólidos totais dos extratos.....	67
5.4.3	Avaliação analítica dos extratos.....	68
5.4.3.1	Quantificação de compostos fenólicos.....	68
5.4.3.2	Atividade antioxidante.....	68
5.4.4	Adaptação do extrato para o ensaio biológico.....	69
5.4.4.1	Determinação da quantidade de extrato.....	71
5.5	Experimento biológico.....	71
5.5.1	Animais.....	71
5.5.1.1	Coleta de material biológico.....	72
5.5.2	Dietas.....	73
5.5.2.1	Composição das dietas.....	74
5.5.2.2	Preparação das dietas.....	75
5.5.2.3	Perfil lipídico das dietas.....	76
5.5.3	Administração dos extratos de BV e BS (EV e ES).....	77
5.5.4	Experimento piloto.....	80
5.5.5	Experimento principal.....	80
5.5.6	Determinação do perfil lipídico no plasma.....	82
5.5.7	Avaliação da capacidade de inibição da oxidação das LDL.....	
5.5.8	Preparo do homogenato de tecido hepático.....	
5.5.9	Quantificação de proteínas totais.....	85
5.5.10	Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	86
5.5.10.1	Superóxido dismutase.....	86
5.5.10.2	Glutathione peroxidase.....	87
5.5.10.3	Catalase.....	88

5.6	Desenvolvimento e caracterização de preparações com FBV e FBS,,,,,	91
5.6.1	Desenvolvimento de picolé e <i>sorbet</i> ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	91
5.6.2.	Análise microbiológica das preparações,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	94
5.6.3	Análise de cor,,,	94
5.6.4	Análise sensorial,,,	95
5.7	Análise estatística,,,	97
6.	RESULTADOS e DISCUSSÃO	98
6.1	Caracterização da matéria-prima.....	99
6.1.1	Granulometria das farinhas.....	99
6.1.2	Composição centesimal.....	100
6.1.3	Perfil de ácidos graxos.....	103
6.1.4	Determinação de compostos fenólicos.....	104
6.1.4.1	Fenólicos totais.....	104
6.1.4.2	Interferência do ácido ascórbico.....	106
6.1.4.3	Resveratrol.....	106
6.2	Extratos de FBV e FBS.....	109
6.2.1	Sólidos totais, fenólicos totais e atividade antioxidante.....	109
6.2.2	Adaptação do extrato para o ensaio biológico.....	115
6.2.3	Administração dos extratos.....	116
6.3	Dietas.....	117
6.3.1	Perfil lipídico das dietas.....	118
6.4	Experimento piloto.....	119
6.4.1	Peso dos animais, consumo de ração e água.....	119
6.4.2	Perfil lipídico plasmático.....	120
6.5	Experimento principal.....	12
6.5.1	Peso dos animais, consumo de dieta e água.....	12
6.5.2	Perfil lipídico plasmático.....	124
6.5.3	Inibição da oxidação de LDL-c.....	133
6.5.4	Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	137
6.6	Desenvolvimento e caracterização de preparações com FBV e FBS....	142
6.6.1	Desenvolvimento de picolé e <i>sorbet</i>	142
6.6.2.	Análise microbiológica.....	143

6.6.3	Análise de cor.....	144
6.6.3.1	Picolés.....	144
6.6.3.2	Sorbets.....	145
6.6.4	Análise sensorial.....	147
6.6.4.1	Picolés.....	147
6.6.4.2	Sorbets.....	150
7.	CONCLUSÕES.....	154
8.	REFERÊNCIAS.....	157
ANEXOS		174
ANEXO 1 - Protocolo nº 04/07-CEP-IMT.....		A-1
ANEXO 2 - Protocolo nº 348-Comissão de Ensino e Pesquisa-HC-FMUSP..		A-2
ANEXO 3 - Limites microbiológicos para sorvetes.....		A-3
ANEXO 4 - Comitê de Ética e Pesquisa – CEP/FSP/USP.....		A-4
ANEXO 5 - Termo de Consentimento – análise sensorial.....		A-5
ANEXO 6 – Ficha de avaliação sensorial.....		A-6
ANEXO 7 – Ficha de avaliação de preferência.....		A-7
ANEXO 8 – Cromatograma padrão de ácidos graxos.....		A-8
ANEXO 9 – Cromatogramas de análise de ácidos graxos em FBV e FBS.....		A-9
ANEXO 10 – Cromatogramas de análise de ácidos graxos das dietas.....		A-
ANEXO 11 - Análise microbiológica de <i>sorbet</i> de FBV.....		A -
ANEXO 12 - Análise microbiológica de <i>sorbet</i> de FBS.....		A-12
ANEXO 13 - Análise microbiológica de picolé de FBS.....		A-13
ANEXO 14 - Análise microbiológica de picolé de FBV.....		A-14
ANEXO 15 – Comprovante do pedido de patente.....		A-15
ANEXO 16 - Artigo submetido para publicação – JFCA.....		A-16
ANEXO 17 - Artigo submetido para publicação – <i>Acta Horticulturae</i>		A-17

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Atividade antioxidante
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AH	Antioxidante
AP-1	Proteína ativadora 1
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BS	Bagço de uva do suco
BSA	Soro de albumina bovina
°C	Graus Celsius
CAT	Catalase
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
cm	centímetro
CT	Colesterol total
Cu	Cobre
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EV	Extrato de bagço do vinho
ES	Extrato de bagço do suco
Fe	Ferro
g	Grama
GL	Gay-Lussac
GPx	Glutathione peroxidase

GR	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
GSH	Glutathione reduzida
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta densidade
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IMT	Instituto de Medicina Tropical
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol
Kg	Kilograma
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
Mn	Manganês
m	Metro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µmol	Micromol
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
nm	Nanômetro
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NO•	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ • ⁻	Radical superóxido
O ₃	Ozônio
OH•	Radical hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão fosfato
ROH	Hidróxido de cumeno
ROOH	Hidroperóxido de cumeno
ROH	Peróxido de cumeno
rpm	Rotação por minuto
SOD	superóxido dismutase
TG	Triglicérides
TRIS	Tampão hidroximetil aminometano
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VIS	Visível
USP	Universidade de São Paulo
v:v	Volume:volume
XOD	Xantina oxidase
Zn	Zinco

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1.	Proteção enzimática contra ERO.....	36
Tabela 5.1.	Composição da ração comercial Nuvilab® CR1 fornecida no período de aclimação.....	74
Tabela 5.2.	Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico após o período de aclimação.....	75
Tabela 6.1.	Composição centesimal, em base seca, lipídica em farinhas de bagaço de uva do vinho (Cabernet Sauvignon) e do suco (Isabel).....	100
Tabela 6.2.	Perfil de ácidos graxos (médias $\pm$ desvios-padrão) em FBV e FBS.....	103
Tabela 6.3.	Concentração de fenólicos totais em FBV e BVS.....	104
Tabela 6.4.	Concentração (média $\pm$ desvio-padrão) de <i>trans</i> -resveratrol em amostras de FBV e FBS.....	106
Tabela 6.5.	Valores médios $\pm$ desvios padrão de sólidos totais, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de farinha de bagaço do vinho (EV).....	110
Tabela 6.6.	Valores médios $\pm$ desvios padrão de sólidos totais, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de farinha de bagaço do suco (ES).....	110
Tabela 6.7.	Valores médios $\pm$ desvios padrão do teor de fenólicos totais em peso seco no extrato de BV e BS, pelo método 1 (LARRAURI <i>et al.</i> , 1996).....	114
Tabela 6.8.	Valores médios $\pm$ desvios padrão do teor de compostos fenólicos totais e base seca do extratos concentrados para utilização no ensaio biológico.....	115
Tabela 6.9.	Perfil de ácidos graxos das dietas controle e hiperlipemiante.....	107

Tabela 6.10.	Peso inicial e final, ganho de peso, consumo de dieta, água e coeficiente de eficiência alimentar (média $\pm$ desvios-padrão) dos hamsters do experimento piloto.....	119
Tabela 6.11.	Perfil lipídico em plasma dos hamsters do estudo piloto.....	120
Tabela 6.12.	Peso inicial e final, ganho de peso, consumo de água, dieta e coeficiente de eficiência alimentar (média $\pm$ desvios-padrão) dos hamsters do experimento principal.....	122
Tabela 6.13.	Média $\pm$ desvios-padrão de colesterol total (CT), HDL-c, não-HDL-c e triglicérides (TG) nos grupos experimentais.....	124
Tabela 6.14.	<i>Lag time</i> (min) de oxidação de LDL-c em <i>pool</i> de plasma de hamsters.....	134
Tabela 6.15.	Atividade das enzimas antioxidantes. Valores em média $\pm$ desvios padrão.....	137
Tabela 6.16.	Formulação do picolé de FBV e FBS.....	142
Tabela 6.17.	Formulação do <i>sorbet</i> de FBV e FBS.....	143
Tabela 6.18.	Parâmetros de cor das farinhas de BS e BV, dos picolés obtidos com estas farinhas e de picolé comercial, sabor uva.....	144
Tabela 6.19.	Diferença de cor entre as amostras de picolés, farinhas e picolé comercial.....	145
Tabela 6.20.	Parâmetros de cor das farinhas de BS e BV e dos <i>sorbets</i> obtidos com as farinhas.....	146
Tabela 6.21.	Diferença de cor entre das amostras de <i>sorbets</i> e farinhas.....	147
Tabela 6.22.	Aceitação dos picolés com BV e BS segundo atributos sensoriais e escala hedônica. Valores apresentados como média $\pm$ desvios-padrão.....	135

Tabela 6.23.	Aceitação dos atributos sensoriais dos picolés com bagaço do vinho (BV) e bagaço do suco (BS) de acordo com a escala hedônica.....	149
Tabela 6.24.	Parâmetros de aceitação dos <i>sorbet</i> de bagaço do suco (BS) e de bagaço do vinho (BV).....	151
Tabela 6.25.	Aceitação dos atributos sensoriais dos <i>sorbets</i> com bagaço do vinho (BV) e bagaço do suco (BS) de acordo com a escala hedônica.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Formação de ERO no meio intracelular.....	27
Figura 2.2. Formação de lesão aterosclerótica.....	32
Figura 2.3. Relações entre estresse oxidativo, antioxidantes e doença.....	33
Figura 2.4. Principais fontes de ERO e mecanismos de defesa.....	37
Figura 2.5. Classes de polifenóis alimentares.....	40
Figura 2.6. Uvas Cabernet Sauvignon e Isabel.....	44
Figura 2.7. Fluxograma do processo de vinificação.....	46
Figura 5.1. Bagaço de uva <i>Cabernet Sauvignon</i> , resultante da vinificação.....	56
Figura 5.2. Bagaço de uva Isabel, resultante da produção de suco de uva.....	57
Figura 5.3. Fluxograma de processamento das matérias-primas.....	60
Figura 5.4. Fluxograma de obtenção do extrato para o experimento biológico.....	70
Figura 5.5. Alojamento dos hamsters no biotério, em gaiolas individuais.....	72
Figura 5.6. Cânula de gavagem acoplada em seringa utilizada no experimento biológico.....	79
Figura 5.7. Administração de extrato de bagaço de uva por gavagem.....	79
Figura 5.8. Esquema do protocolo do ensaio biológico (modelo animal).....	90
Figura 5.9. Fluxograma de produção de <i>sorbet</i>	92
Figura 5.10. Fluxograma de produção de picolés.....	93
Figura 6.1. Farinhas de bagaço de uva do vinho e do suco.....	99
Figura 6.2. Teor de <i>trans</i> -resveratrol em FBV e FBS.....	107
Figura 6.3. Cromatograma da análise de <i>trans</i> -resveratrol: FBV e FBS.....	108
Figura 6.4. Curva padrão para a determinação de compostos fenólicos totais.....	113

Figura 6.5.	Dieta controle.....	117
Figura 6.6.	Dieta hiperlipemiante.....	117
Figura 6.7.	Dieta hiperlipemiante com 20% de FBV.....	117
Figura 6.8.	Dieta hiperlipemiante com 20% de FBS.....	117
Figura 6.9.	Boxplot do coeficiente de eficiência alimentar (%).....	123
Figura 6.10.	Concentração plasmática de colesterol total em hamsters.....	125
Figura 6.11.	Concentração plasmática da fração HDL-c em hamsters.....	126
Figura 6.12.	Concentração plasmática da fração não-HDL-c em hamsters.....	127
Figura 6.13.	Concentração plasmática de triglicérides em hamsters.....	128
Figura 6.14.	<i>Lag time</i> (min) de oxidação de LDL-c em <i>pool</i> de plasma de hamsters.....	135
Figura 6.15.	Intervalo de confiança (95%) da inibição da oxidação de LDL-c em <i>pool</i> de plasma de hamsters.....	136
Figura 6.16.	Intervalo de confiança da atividade de GPx.....	138
Figura 6.17.	Intervalo de confiança da atividade de SOD.....	139
Figura 6.18.	Intervalo de confiança da atividade de CAT.....	140
Figura 6.19.	Picolé de bagaço do vinho e picolé de bagaço do suco.....	142
Figura 6.20.	<i>Sorbet</i> de bagaço do vinho e <i>sorbet</i> de bagaço do suco.....	143
Figura 6.21.	Preferência pela matéria-prima utilizada no picolé (BV ou BS)..	149
Figura 6.22.	Preferência pela matéria-prima utilizada no <i>sorbet</i> (BV ou BS)..	152

1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento tem sido foco de interesse por parte de cientistas e filósofos há muito tempo. Entretanto, nas últimas décadas esse interesse aumentou consideravelmente, em parte devido ao crescente aumento da proporção de idosos na população mundial. No aspecto científico, o envelhecimento é um processo muito complexo, com características multifatoriais. Para explicar este fenômeno, diversas teorias foram propostas, mas a teoria genômica e a dos radicais livres talvez sejam as mais importantes, e parecem estar intimamente relacionadas (KNIGHT, 2000). Há muitas evidências corroborando, direta ou indiretamente, a teoria dos radicais livres. Por exemplo, diversas doenças relacionadas com o envelhecimento, como câncer e aterosclerose são claramente afetadas por processos oxidativos. Além disso, a existência de mecanismos naturais de prevenção contra danos celulares oxidativos como as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) é uma indicação de que os radicais livres possuem um papel chave no envelhecimento e doenças associadas (RAHMAN, 2007; SPITELLER, 2007). A aterogênese constitui um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), e parece estar fortemente associada à oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) (SIES *et al.*, 2005). Dislipidemias, como hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia também elevam o risco de DCV, principais causas de mortalidade no Brasil (BRASIL, 2006).

Na tentativa de mitigar o impacto dos processos oxidativos envolvendo radicais livres, diversas estratégias são recomendadas. Entre as mais importantes estão a atividade física e dieta à base de alimentos funcionais (FERRARI e TORRES, 2003; FERRARI, 2007), que atualmente são reconhecidos como fatores

essenciais na adoção de um estilo de vida saudável (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007).

O consumo habitual de antioxidantes tem sido amplamente recomendado por seus efeitos biológicos diversos, particularmente a redução do estresse oxidativo. Os polifenóis são os mais abundantes antioxidantes na dieta, e evidências correntes indicam que estes compostos contribuem para a prevenção de DCV, câncer e outras doenças crônicas (SCALBERT *et al.*, 2005). No entanto, aspectos como biodisponibilidade e toxicidade dos polifenóis ainda não foram totalmente elucidados. Este tem sido o tema central em diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios de intervenção clínica. Neste contexto, uma das tendências atuais é o estudo de subprodutos do processamento de frutas e hortaliças como potenciais fontes de antioxidantes, além de outros nutrientes com reconhecidos efeitos benéficos, como as fibras alimentares (SCHIEBER *et al.*, 2001).

O bagaço de uva, subproduto mais importante da vinificação e produção de sucos, constitui uma excelente fonte de antioxidantes e fibras. Isto, aliado a seu baixo custo, confere a este material amplas possibilidades de aplicação como ingrediente funcional. Um número crescente de pesquisas tem explorado os subprodutos da uva como um possível ingrediente alimentar, mas são escassos os relatos comparando o efeito biológico entre diferentes espécies de uvas, principalmente de bagaço de uvas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi comparar a resposta de um modelo animal à administração de subproduto de duas variedades de uva, além de avaliar seus aspectos sensoriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse oxidativo

As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas a danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser originadas tanto endogenamente quanto exogenamente. As formadas endogenamente, ou no meio intracelular, podem ser provenientes de alguma disfunção biológica (por exemplo, como uma resposta inflamatória celular), ou como consequência natural do próprio metabolismo celular (SIES, 1997). Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, destacando-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), conforme ilustrado na Figura 2.1.

Figura 2.1. Formação de ERO no meio intracelular.

Estas espécies são também denominadas genericamente de radicais livres, cujo elétron encontra-se livre (desemparelhado) em sua órbita externa, e centrado nos átomos de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio - ERN). (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Dentro das moléculas, os elétrons normalmente se reúnem em pares. Um par de elétrons é mais estável que os elétrons isolados, e o não-emparelhamento de elétrons da última camada confere uma alta reatividade a estas moléculas,

propiciando reações em cadeia que instabilizam o meio molecular. As ERO e ERN abrangem não somente radicais como hidroxila ($\text{OH}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)² (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

O acúmulo destas espécies leva à injúria celular, e seus principais alvos incluem DNA, lipídios, proteínas e açúcares. A ordem de preferência de ataque irá variar conforme alguns fatores: 1) o local onde a espécie reativa é gerada; 2) a suscetibilidade de uma biomolécula ser oxidada e 3) a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula (EVANS *et al.*, 2004).

Por outro lado, os radicais livres também exercem efeitos benéficos quando envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (HALLIWELL, 2007). Ou seja, a formação de ERO, em níveis fisiológicos, não é necessariamente lesiva; estas espécies, quando produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004).

As fontes exógenas de ERO incluem luz ultravioleta (UV), irradiação ionizante e agentes químicos (SIES, 1997).

Evolutivamente, estratégias de defesa antioxidante foram desenvolvidas para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio. Entretanto, quando a formação de ERO/ERN excede a capacidade antioxidante celular, ocorre uma condição denominada estresse oxidativo, ou seja, um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, sendo uma inevitável consequência da vida

aeróbica, que pode ser bastante danoso às células (DAVIES, 2001). O estresse oxidativo tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças e condições patológicas como: artrite, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro (HALLIWELL, 1990).

2.1.1 Oxidação lipídica

Entre os efeitos patológicos associados ao estresse oxidativo, a peroxidação lipídica encontra-se entre os mais relevantes para saúde humana. A oxidação lipídica ou lipoperoxidação consiste num processo de deterioração oxidativa de lipídios insaturados, no qual existe uma relação direta entre o grau de insaturação e a susceptibilidade à oxidação (COSGROVE *et al.*, 1987). O radical hidroxila é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora desta reação, que pode ocorrer tanto em alimentos quanto em sistemas biológicos (KAHL e HILDEBRANDT, 1986). Em alimentos, resultam em alterações nas suas características sensoriais e nutricionais, reduzindo sua vida útil (NAWAR, 1996). TORRES *et al.* (1998), estudando a influência da adição de sal na estabilidade oxidativa em hamburques, alertaram para o risco de se consumir alimentos cujas frações lipídicas sofreram processos oxidativos, gerando produtos citotóxicos, como o malonaldeído. Evidências sugerem que o malonaldeído, um produto secundário da oxidação lipídica, é potencialmente cancerígeno (SHAMBERGER *et al.*, 1974) e mutagênico (MUKAI e GOLDSTEIN, 1976; PEARSON *et al.*, 1983).

Em sistemas biológicos, membranas celulares de organelas (mitocôndrias, peroxissomas) são os principais alvos das ERO via oxidação lipídica, uma vez que estas organelas contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (MACHLIN e BENDICH, 1987). Estes processos oxidativos resultam em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas, e os produtos tóxicos gerados resultam invariavelmente na morte celular (OLIVIERI *et al.*, 1994).

2.2 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV), principalmente as doenças coronarianas, são as principais causas de mortalidade no Brasil e diversos países ocidentais, causando 16,7 milhões de mortes por ano. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a projeção desta taxa para o ano de 2030 é de 24 milhões (WHO, 2004).

Desde a década de 40, o Brasil vem passando por um processo de inversão das curvas de morbidade e mortalidade em que se observa um declínio na mortalidade por doenças infecciosas e um concomitante aumento na mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis. Esse processo é chamado de transição epidemiológica, e ocorreu em todos os países desenvolvidos onde a população de idosos é cada vez mais expressiva. Em 1930, as DCV eram responsáveis por 11,8 % das mortes no Brasil; este número evoluiu para 33,0% em 1985 (PRATA, 1992).

2.2.1 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada

íntima de artérias de médio e grande calibre (SPOSITO *et al.*, 2007). É indicada como a principal causa do desenvolvimento de doenças coronarianas, cerebrais e de vasos arteriais periféricos (SELWYN, 2007).

A dislipidemia caracterizada pela elevada concentração plasmática da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e a baixa concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) tem sido apontada como um dos mais importantes fatores de risco para a doença aterosclerótica coronariana (MILLER e MILLER, 1975; RUDEL e KESAINIEMI, 2000; SMITH *et al.*, 2004).

Evidências recentes estabeleceram estreita relação entre o consumo qualitativo e quantitativo de gorduras e de colesterol com as doenças coronarianas, indicando que a dieta pode contribuir de forma decisiva para a etiologia das dislipidemias, obesidade e hipertensão (MA *et al.* 2008, TOFT *et al.* 2007). MARTINS *et al.* (1994) identificaram hábitos alimentares aterogênicos, ou seja, alta proporção de gorduras saturadas em relação a gorduras insaturadas em regiões metropolitanas no sudeste do Brasil.

ROSS e GLOMSET (1976) propuseram pela primeira vez a teoria da disfunção endotelial, um processo inflamatório, como o ponto de partida para a aterogênese. Uma das possíveis causas desta disfunção é a elevada concentração de LDL (*low density lipoprotein*, lipoproteína de baixa densidade) oxidada, mas não de LDL em sua forma natural. É importante destacar que as LDL nativas, em sua forma natural, não são patogênicas – tornam-se agressivas somente quando modificadas por oxidação. Uma vez modificada, a LDL é captada pelo macrófago que, ingurgitado de gordura, forma as células esponjosas (*foam cells*). Por sua vez, estas formam o núcleo necrótico, componente da placa de ateroma (Figura 2.2). Neste processo, a

LDL modificada torna-se citotóxica, inclusive para a célula endotelial, o que leva à liberação de citocinas. Na camada íntima da artéria, macrófagos ingurgitados de partículas de LDL oxidadas ficam retidos, perdendo sua mobilidade e função removedora de lipídios (FRANÇA, 2002).

Figura 2.2. Formação de lesão aterosclerótica.

As LDL circulantes no organismo são “alvos” para a oxidação deletéria *in vivo*, resultando no acúmulo de lipoproteínas aterogênicas (STEINBERG e WIZTUM, 1990). Há evidências sugerindo que a modificação oxidativa das LDL é um processo mediado por radicais livres de oxigênio (ERO), catalisado pela presença de metais de transição, como ferro e cobre, ou pela ceruloplasmina, que atua como pró-oxidante (MOREL *et al.*, 1984).

2.3 Defesa antioxidante

O desenvolvimento de sistemas naturais de defesa antioxidante pelo organismo está relacionado ao processo evolutivo da vida anaeróbica para a aeróbica. Os primeiros organismos vivos sobre a Terra eram essencialmente anaeróbios; sua

evolução para a forma de vida aeróbica envolveu a adaptação a maiores níveis de oxigênio. Para que isto fosse possível, foi necessário o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante contra as propriedades tóxicas do oxigênio (GUTTERIDGE, 1995).

HALLIWELL e GUTERIDGE (1999) definiram os compostos antioxidantes como substâncias que, em concentrações relativamente baixas, competem com outros substratos oxidáveis, diminuindo significativamente ou inibindo a oxidação destes substratos.

Ainda não é totalmente compreendida a relação entre estresse oxidativo, desenvolvimento de doenças e o impacto que os antioxidantes podem causar na redução do risco destas doenças. A intervenção dos antioxidantes sobre o estresse oxidativo pode ocorrer de diferentes maneiras, conforme ilustrado na Figura 2.3.

Figura 2.3. Relações entre estresse oxidativo, antioxidantes e doença (FREI, 2004).

O modelo proposto na Figura 2.3. apresenta duas situações: no item 1, a presença dos fatores de risco potencializa o estresse oxidativo, que por sua vez leva ao desenvolvimento de doenças. Neste caso, a intervenção dos antioxidantes reduz o estresse e portanto o risco de doenças. No item 2, os fatores de risco levam ao estresse oxidativo e causam a doença independentemente da presença do dano oxidativo. Ou seja, a doença por si só pode levar ao estresse oxidativo, e a intervenção dos antioxidantes irá influenciar o estado oxidativo; contudo, não irá afetar a doença diretamente. Para melhor compreender o papel dos antioxidantes na prevenção de doenças, o autor sugere que ensaios clínicos controlados devem ser empreendidos, avaliando-se o estado oxidativo antes e após o uso de antioxidantes e, para tanto, pelo menos dois biomarcadores confiáveis serão necessários.

De qualquer modo, parece haver consenso na literatura sobre o fato de que os antioxidantes, direta ou indiretamente, podem mitigar eventos patológicos associados a danos oxidativos (FERRARI e TORRES, 2003; KAWASHIMA *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2007; NEYESTANI *et al.*, 2007; SOLFRIZZI *et al.*, 2008).

2.3.1 Antioxidantes endógenos

Os antioxidantes podem ser divididos genericamente em endógenos e exógenos. Os antioxidantes endógenos são sintetizados no organismo humano, e constituem um sofisticado sistema enzimático e não enzimático de defesa. Os antioxidantes enzimáticos constituem a primeira linha de defesa contra ERO. As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase; catalase e glutathione peroxidase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

2.3.1.1 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima presente nos organismos aeróbicos sob três formas distintas, de acordo com a presença do cofator metálico no sítio ativo: o cobre e Zinco (Cu/Zn- SOD); o manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD). As SODs são encontradas no citosol de células eucariontes, na mitocôndria e no espaço celular dos mamíferos e catalisam a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), via reação de dismutação. O $O_2^{\bullet-}$ é a base para outras formas ativas de oxigênio e o H_2O_2 é capturado e degradado através da ação da catalase e peroxidase (Tabela 2.1) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; SIES, 1997).

2.3.1.2 Catalase

A catalase (CAT) elimina H_2O_2 por meio de uma dismutação bivalente, onde H_2O_2 é transformado em O_2 e H_2O (Tabela 2.1). É uma enzima tetramérica que contém grupos heme em sua estrutura, sendo encontrada em todos os organismos vivos, predominantemente nos peroxissomos. Alternativamente, as catalases podem usar outros doadores de elétrons (etanol, ascorbato e compostos fenólicos) em condições de baixa concentração (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999).

2.3.1.3 Glutathiona peroxidase

Peroxidases são enzimas que usam vários doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 a H_2O . A principal peroxidase em vertebrados é a glutathiona peroxidase (GSH-Px, ou GPx), uma enzima que contém um aminoácido, a seleno-

cisteína. A substituição do enxofre por selênio faz com que esta enzima adquira um grande potencial redox para o seu substrato (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999). Na reação de redução, o tripeptídeo glutathione (GSH, ou glutathione reduzida) é o substrato, e é oxidado formando um dissulfeto (GSSG, ou glutathione oxidada), mas a glutathione redutase (GR) o converte novamente a GSH, usando NADPH (Tabela 2.1).

A GSH é o maior composto tiol de baixo peso molecular em vegetais e animais, constituindo-se num importante antioxidante natural. Tanto pode estar presente na dieta humana como pode ser sintetizado no organismo humano. Detoxifica metabólitos reativos de oxigênio oriundos do ambiente e do próprio organismo. O GSH é um tripeptídeo (L γ -glutamina, L-cisteína-glicina), contém na cadeia cisteína um grupo funcional CH-SH, que serve como um sítio ativo para muitos tióis. Uma característica dos tióis é atuar como um agente redutor, aceitando elétrons das ERO, neutralizando-os e transformando-os em espécies menos tóxicas (SAGARA *et al.*, 1998).

Tabela 2.1. Proteção enzimática contra ERO.

Superóxido Dismutase (SOD – citoplasma, mitocôndria)

Glutathione Peroxidase (GPx – fora do peroxissoma)

Glutathione Redutase (GRd – fora do peroxissoma)

Catalase (CAT – dentro do peroxissoma)

Adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE (1990) e SIES (1997).

As três enzimas são necessárias para a sobrevivência da célula, mesmo em condições normais. Elas atuam por mecanismos sinérgicos de modo a garantir a proteção celular. Contudo, esta proteção é assegurada apenas quando há manutenção de um equilíbrio na sua atividade, que pode ser afetado na presença de ERO (MICHIELS *et al.*, 1994).

2.3.2 Antioxidantes em alimentos

Dietas ricas em lipídios poliinsaturados favorecem o estresse oxidativo por mecanismos pró-oxidantes. Em contrapartida, frutas e hortaliças fornecem uma variedade de antioxidantes (THOMAS, 2003). A Figura 2.4 apresenta, de forma resumida, as principais ERO e mecanismos de defesa antioxidante.

Figura 2.4. Principais fontes de ERO e mecanismos de defesa (adaptado de SEIFRIED *et al.*, 2007).

AGPI=ácidos graxos poliinsaturados; $O_2^{\bullet-}$ =superóxido; H_2O_2 =peróxido de hidrogênio; $OH^{\bullet}$ =hidroxila; $(^1O_2)^2$ =oxigênio singlete; SOD=superóxido dismutase; GPx=glutathione peroxidase.

Bebidas como sucos de frutas, vinhos (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1999) e chás (BASTOS e TORRES, 2003) também representam ótimas fontes de antioxidantes alimentares.

Inúmeros estudos com antioxidantes, seja na forma de alimentos ou suplementos, convergem para a hipótese de que seu consumo habitual pode ser um importante fator de redução de risco de doenças crônicas não transmissíveis (FERRARI e TORRES, 2003; KAWASHIMA *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2007; NEYESTANI *et al.*, 2007; SOLFRIZZI *et al.*, 2008).

Entre os componentes naturais de plantas capazes de agir como antioxidantes se incluem: vitamina E, vitamina C, β -caroteno e outros carotenóides, alguns minerais (principalmente os que constituem enzimas, como o selênio) e compostos fenólicos. Estes últimos constituem um crescente foco de investigações científicas por seus efeitos biológicos (SCALBERT *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2007; HSU e YEN, 2007; SEIFRIED *et al.*, 2007).

2.3.2.1 Compostos fenólicos

Os antioxidantes presentes em maior quantidade na dieta humana são os compostos fenólicos, que podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas; podem também apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (HAN *et al.*, 2007). Mais de 8000 variantes estruturais foram identificados. Quando formam estruturas poliméricas, são também denominados polifenóis.

Os polifenóis podem ser classificados de acordo com o número de anéis aromáticos e outros elementos ligados à sua estrutura. Desta forma, são distribuídos em quatro grupos: 1) ácidos fenólicos com subclasses derivadas de ácidos hidroxibenzóicos como ácido gálico e ácido hidroxicinâmico; 2) flavonóides – a mais numerosa e diversificada subclasse de polifenóis, a qual inclui flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavonóis; 3) estilbenos, cujo representante mais conhecido é o resveratrol; 4) taninos, que são subdivididos em dois grupos: galotaninos e elagitaninos ou taninos hidrolisáveis (Figura 2.5) (BUTTERFIELD *et al.*, 2002).

Uma diversidade de propriedades bioativas já foram identificadas em polifenóis. Devido ao seu potencial antioxidante tanto em meio hidrofílico quanto lipofílico, o papel dos polifenóis na manutenção da homeostase redox no organismo, reduzindo o estresse oxidativo, é uma das ações mais importantes e mais citadas (HAN *et al.*, 2007). Além disso, foram evidenciados efeitos anti-ateroscleróticos (HARTMAN *et al.*, 2006), neuroprotetores (BASTIANETTO *et al.*, 2007), anti-inflamatórios (CAMACHO-BARQUERO *et al.*, 2007), anti-carcinogênicos (KUNNUMAKKARA *et al.*, 2007), anti-alergênicos (AKIYAMA *et al.*, 2005), bem como redução de risco de diabetes (JOHNSTON *et al.*, 2005), melhora da função imunológica (ALVAREZ *et al.*, 2006) e da doença pulmonar obstrutiva crônica (XU *et al.*, 2007).

Figura 2.5. Classes de polifenóis alimentares (BUTTERFIELD *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido empregados para elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da transcrição gênica. Neste contexto, os polifenóis têm se mostrado como substâncias promissoras. SUBBARAMAIAH *et al.* (1998) utilizaram o resveratrol em um experimento *in vitro*, demonstrando que este polifenol inibiu a ativação da proteína ativadora 1 (AP-1), um dos fatores de transcrição que contribuem para a sobrevivência e multiplicação de células tumorais.

Polifenóis extraídos de sementes de uva (catequinas e proantocianidinas) foram empregados em outro estudo *in vitro* com células cardíacas, aumentando a atividade das enzimas superóxido dismutase, GST (glutathione S-transferase) e catalase (DU *et al.*, 2007).

Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides, os estilbenos, os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000).

O resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxestilbeno) é um dos compostos alimentares mais estudados atualmente. Pertence à classe dos estilbenos, e foi isolado pela primeira vez em 1974 (KHAN *et al.*, 1986).

As fontes mais abundantes de resveratrol são as uvas *Vitis vinífera*, *V. labrusca* e *V. muscadine*, que contém 50 a 100 µg/g (WATERHOUSE, 1995). A maior parte deste polifenol concentra-se na casca da uva, em resposta à agressão de fungos (FRÉMONT, 2000). Além de atividade antifúngica, este composto possui propriedades antioxidantes (ROBB *et al.*, 2008), antitumorais (SHANKAR *et al.*, 2007) e antiinflamatórias (DAS e DAS, 2007), entre outras. Estes efeitos estão associados à redução de risco de câncer, doenças cardiovasculares e outros processos

patológicos inflamatórios, além de reduzir disfunções orgânicas relacionadas ao estresse oxidativo (FRÉMONT, 2000).

Na classe dos flavonóides, as antocianinas são importantes fenólicos presentes em uvas. São, ao mesmo tempo, antioxidantes e pigmentos, que conferem aos vegetais as cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho. Ou seja, as antocianinas são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas (RENAUD e DE LORGERIL, 1992).

Apesar de estarem implicados à promoção da saúde, deve-se ressaltar que altas doses de polifenóis podem resultar em efeitos tóxicos e atividade pró-oxidante (RUCINSKA *et al.*, 2007). Adicionalmente, há que se considerar a inconsistência entre alguns dados *in vitro* e *in vivo* – isto provavelmente se deve ao conhecimento ainda limitado sobre a biodisponibilidade dos polifenóis (HAN *et al.*, 2007). Estas premissas devem ser consideradas antes de se aplicar estas substâncias (particularmente na forma isolada, como suplementos) em ensaios de intervenção clínica com humanos.

2.4 Uva

As uvas estão entre as frutas mais cultivadas no mundo. Em termos de produção mundial de frutas, correspondem ao segundo maior cultivo (cerca de 66 milhões de toneladas/ano), perdendo apenas para o cultivo de bananas (FAO, 2006).

Fruto da videira ou vinha, a uva possui a seguinte classificação botânica (MACRAE *et al.*, 1993):

- Ordem: Ramnidea

- Família: Vitacea
- Sub-família: Ampelidea
- Gênero: Vitis
- Sub-gênero: Euvitis
- Espécies: *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, *Vitis rupestris*, *Vitis aestivalis*, *Vitis riparia*, *Vitis cinérea*, *Vitis rotundifolia*.

Cada uma das espécies possui diferentes variedades, denominadas cepas ou castas. As espécies vinífera e labrusca são as mais cultivadas, seja para produção de vinhos ou para consumo na sua forma natural.

No Brasil, as raízes históricas estão na vitivinicultura hispano-americana quando, por volta de 1626, um padre jesuíta trouxe algumas cepas de origem espanhola, iniciando desta forma a cultura da uva no Rio Grande do Sul. A viticultura tornou-se expressiva com a introdução de uvas americanas, particularmente a Isabel, entre 1839 a 1842 (PARIS, 2008).

A uva Isabel é uma das principais cultivares de *Vitis labrusca*, espécie originária do Sul dos Estados Unidos. Na década de 1850, despertou interesse dos viticultores europeus devido à sua resistência ao oídio, doença que causava enorme prejuízo à viticultura mundial. Na Serra Gaúcha brasileira são cultivados 8.979 hectares desta uva, que representam aproximadamente 45% de toda a uva produzida nessa região (RIZZON e MIELE, 2005).

A polpa da uva *vitis labrusca* possui a seguinte composição em 100 g (CTENAS *et al.*, 2000):

- Energia – 70 kcal
- Carboidratos – 5,0 g
- Proteínas – 0,6 g
- Lipídios – 0,6 g

- Vitamina C – 10 mg
- Fibras – 1,6 g

A uva Cabernet Sauvignon é originária da região de Bordeaux, França, e atualmente bastante difundida na maior parte dos países vitivinícolas. Foi introduzida no Brasil em 1921, mas somente depois de 1980 verificou-se um incremento de seu plantio, no estado do Rio Grande do Sul. Para a safra de 1995, somente na Serra Gaúcha foram colhidos 4,91 milhões de quilos desta cepa (BRASIL, 1996). Pelas suas propriedades físico-químicas, a Cabernet Sauvignon é muito utilizada na elaboração de vinhos de guarda, ou vinhos “maduros”. Uma destas propriedades é o alto teor de antocianinas na casca, o que dá às uvas viníferas uma coloração característica, diferenciando-as das uvas da espécie *labrusca* (Figura 2.6).

Figura 2.6. Uvas Cabernet Sauvignon (à esquerda) e Isabel (à direita).

O fato de ser a uva uma das frutas mais cultivadas no mundo é justificado pelo grande e antigo interesse da humanidade na produção de vinhos - 80% do cultivo de uvas são destinados à produção de vinhos (MAZZA, 1995). Recentes

revisões de literatura têm apresentado os potenciais efeitos benéficos desta bebida, particularmente sobre a função cardiovascular. Estes efeitos são atribuídos principalmente aos polifenóis (ISHIMOTO *et al.*, 2006; KIVINIEMI *et al.*, 2007). Em contrapartida, a busca por fontes de polifenóis isentas de álcool tem estimulado novas investigações, em resposta à preocupação de não se estimular o consumo de bebidas alcoólicas.

2.4.1 Subprodutos da uva

Resíduos ou subprodutos do processamento de vegetais como frutas, vinhos e sucos de frutas representam, pelo seu grande volume, um problema de descarte para a indústria e agricultura. Por outro lado, estes subprodutos são também fontes promissoras de compostos que podem ser aproveitados por suas propriedades tecnológicas e nutricionais (SCHIEBER *et al.*, 2001).

O processo de vinificação gera um produto residual (bagaço) de grandes proporções. Considerando que o bagaço (casca + semente) corresponde a 20% do peso da uva (MAZZA, 1995), e que a produção mundial de uvas é de aproximadamente 66 milhões de toneladas/ano (FAO, 2006), o volume de bagaço resultante da vinificação chega a 9 milhões de toneladas/ano (SCHIEBER *et al.*, 2001).

Na vinificação, o bagaço da uva é recolhido após a etapa da fermentação (Figura 2.7), sendo posteriormente utilizado para a produção de *grappa* (ou

bagaceira), bebida destilada com alto teor alcoólico (40%). Outra aplicação, mas em menor escala, está na fabricação de produtos cosméticos (LOULI *et al.*, 2004).

Figura 2.7. Fluxograma do processo de vinificação (ALBERT e FEDERICO, 2002).

2.4.1.1 Compostos bioativos do bagaço de uva

As uvas e seus subprodutos não são considerados particularmente nutritivos, uma vez que seu teor vitamínico não é significativo. Entretanto, seu teor de antioxidantes naturais e fibras representa uma propriedade benéfica, fato esse que

poderá aumentar seu valor de mercado num futuro próximo (LLOBERA e CAÑELLAS, 2007).

Entre os subprodutos do processamento da uva, o bagaço, produto constituído por cascas e sementes da fruta, é particularmente rico em polifenóis e fibras alimentares. As propriedades nutricionais e fisiológicas do bagaço de uva como ingrediente alimentar foram descritas recentemente por diversos autores (VALIENTE *et al.*, 1995; ALONSO *et al.*, 2002; CHIDAMBARAM *et al.*, 2002; MURTHY *et al.* 2002; NEGRO *et al.*, 2003; GÖKTÜRK *et al.*, 2007; LLOBERA e CAÑELLAS, 2007).

NEGRO *et al.* (2003) identificaram no extrato etanólico do bagaço de uva tinta (*Vitis vinífera*, variedade Negro Amaro), o seguinte perfil de compostos fenólicos (em % do peso seco): fenólicos totais: 4,2%; flavonóides: 4%; antocianinas: 1%; taninos condensados: 2,2%; proantocianidinas: 1,3%. O teor de polifenóis encontrado nas sementes foi maior (8,5%) do que nas cascas de uvas (3,3%).

O potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do bagaço de uva foi pesquisado por MURTHY *et al.* (2002) com uvas viníferas, cultivar Bangalore blue. Os resultados demonstraram uma notável capacidade em remover radicais livres pelo método do DPPH. Na concentração de 100 ppm de extrato metanólico do bagaço, a capacidade de remoção de radicais livres foi semelhante à detectada no padrão (BHA), ou seja, aproximadamente 90%.

O consumo habitual de uma dieta rica em fibras é amplamente recomendado em função dos seus efeitos à saúde, incluindo a melhora da função intestinal e diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol total e LDL-colesterol

(TILOTSON *et al.*, 1997). VALIENTE *et al* (1995) ressaltaram o valor nutricional do bagaço de uva, destacando seu alto teor de fibras (em média 60% do peso seco). Sendo um produto de baixo custo, os autores argumentaram que seu consumo na dieta humana deveria ser considerado.

MARTIN-CARRÓN *et al.* (1997), através de um modelo experimental com ratos Wistar concluíram que, além de melhorar o perfil lipídico plasmático, as fibras do bagaço de uva proporcionaram um aumento no peso e volume fecal em relação ao grupo controle.

SAURA-CALIXTO (1998) identificou fibras no bagaço de uva com características estruturais diferentes das fibras já conhecidas, por estarem associadas a compostos fenólicos como taninos condensados, ácidos fenólicos e flavonóides. Esta seria então uma nova classe de fibras, denominada pelo autor de fibra alimentar antioxidante, uma vez que o composto apresentou atividade antioxidante. Este dado valoriza ainda mais o perfil nutricional do bagaço de uva.

Produtos à base de componentes da uva já são comercializados na forma de suplementos, em pó, comprimidos ou cápsulas (MONAGAS *et al.*, 2006). Muitos destes produtos apresentam apenas um dos componentes, ou seja, casca (SAURA-CALIXTO, 1998) ou semente de uva (GABETTA *et al.*, 2000). Embora haja relatos considerando o bagaço da uva como um todo, vários estudos enfocam apenas um dos componentes isoladamente. No entanto, SHANMUGANAYAGAM *et al.* (2002) evidenciaram que a combinação de casca e semente de uva parece levar a uma interação sinérgica entre as substâncias bioativas na redução da agregação plaquetária. As substâncias da uva foram administradas em cães e humanos, e após oito semanas de estudo, amostras de sangue de ambos os grupos apresentaram os

mesmos resultados, ou seja, a combinação da casca com a semente foi mais eficaz do que a forma isolada (casca ou semente).

2.5 Modelos experimentais de hiperlipidemia em animais

A hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Para investigar a relação entre as disfunções do metabolismo do colesterol e a aterogênese, diversos modelos animais têm sido utilizados, provendo dados relevantes para a compreensão de fatores dietéticos na modulação do metabolismo lipídico e para a descoberta de novos agentes terapêuticos.

Na pesquisa da aterosclerose e dislipidemias, o coelho foi o primeiro modelo animal utilizado. Apesar de esta espécie possuir um metabolismo lipoprotéico semelhante ao de humanos, os níveis plasmáticos de colesterol são extremamente altos, diferentemente dos humanos (JAWIEN *et al.*, 2004; YANNI, 2004;).

O modelo experimental em roedores é o freqüentemente usado para avaliar os efeitos hipolipemiantes de compostos naturais e sintéticos, mas nem todas as espécies apresentam o metabolismo lipoprotéico comparável ao de humanos. Em ratos, por exemplo, a fração HDL é a principal transportadora de colesterol no plasma. A concentração de colesterol plasmático nesta espécie é pouco responsiva pela dieta (JORIS *et al.*, 1983).

O camundongo apoE tem sido utilizado como modelo para estudar fatores que influenciam o desenvolvimento da aterosclerose, incluindo estudos com

fitoquímicos (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2004). O camundongo nocaute de receptor de LDL (LDLr) apresenta concentrações elevadas de LDL, mas não lesões, quando alimentados com dieta normal.

Entre os roedores, o hamster é proposto como a espécie ideal para o estudo do metabolismo lipídico, uma vez que, neste aspecto, há uma semelhança entre hamsters e humanos (SUCKLING *et al.*, 1991). Como em humanos, o principal transportador plasmático de colesterol em hamsters é a LDL, sendo também observado que estes animais desenvolvem hipercolesterolemia de modo semelhante aos humanos quando alimentados com dietas ricas em colesterol e gordura saturada (TERPSTRA, 1991). Além disso, o gene do receptor de LDL em hamsters foi isolado, mostrando forte similaridade com o gene humano (SIMA *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICATIVA

As evidências que se acumularam até o presente momento justificam o interesse no bagaço de uva como um produto de alto valor nutricional, com possibilidades de aplicação como ingrediente funcional para alimentos ou bebidas, suplemento nutracêutico ou mesmo aditivo antioxidante, em substituição a aditivos sintéticos. No entanto, há poucos estudos comparativos entre espécies diferentes de uvas, incluindo o aspecto sensorial. Além disso, não foram encontradas pesquisas brasileiras sobre o aproveitamento dos subprodutos da uva, suas propriedades antioxidantes e os efeitos de sua aplicação em sistemas biológicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial hipolipemiante e antioxidante de bagaço de uvas (*Cabernet Sauvignon* e *Izabel*) em hamsters hipercolesterolemizados pela dieta.

4.2 Objetivos Específicos

- ⇒ Caracterizar nutricionalmente as farinhas de bagaço de uva, determinando a composição proximal, perfil de ácidos graxos, teor de compostos fenólicos e teor de fibras (totais, solúveis e insolúveis);
- ⇒ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos das farinhas de uva;
- ⇒ Avaliar, no plasma de hamsters hipercolesterolêmicos, a capacidade dos subprodutos da uva em melhorar o perfil lipídico e inibir a oxidação da fração LDL-colesterol;
- ⇒ Avaliar, no tecido hepático de hamsters hipercolesterolêmicos, a capacidade dos subprodutos da uva em aumentar a expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase;
- ⇒ Comparar o efeito sobre o perfil lipídico e antioxidante através de diferentes vias de administração dos subprodutos de uva: na forma de extrato aquoso e na forma de suplementação pela dieta;
- ⇒ Desenvolver e avaliar sensorialmente produtos elaborados com as farinhas do bagaço de uva.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Bagaço de uvas

5.1.1 Bagaço de uva do vinho (BV)

Foi utilizado o bagaço resultante da prensagem de uvas tintas, da espécie *Vitis vinífera*, variedade *Cabernet Sauvignon*, da safra de 2005 (Figura 5.1). Este material é constituído por cascas e sementes de uva, obtido após o processo de fermentação.

Alguns talos da uva que se encontravam misturados ao bagaço, foram descartados, de modo que somente cascas e sementes fossem aproveitadas como matéria prima deste estudo. O material foi fornecido pela vinícola Miolo S/A, instalada no município de Bento Gonçalves, estado do Rio Grande do Sul. A escolha por esta empresa se deu pelo fato de ter sido utilizado, anteriormente, um dos produtos desta vinícola - o vinho tinto Miolo®, em estudo anterior sobre a atividade antioxidante de vinhos e sucos de uva brasileiros (ISHIMOTO, 2003). Entre todas as amostras do estudo, esta bebida apresentou os melhores resultados em termos de atividade antioxidante.

Figura 5.1. Bagaço de uva *Cabernet Sauvignon*, resultante da vinificação.

5.1.2 Bagaço de uva do suco (BS)

O resíduo da produção de suco de uva, da espécie *Vitis labrusca*, cepa da variedade Isabel (Figura 5.2) foi fornecido pela empresa Produtos Alimentícios Superbom Indústria e Comércio Ltda, localizada no município de Lebon Régis, Santa Catarina. A aquisição foi feita em fevereiro de 2006, período de colheita da uva para a produção do suco em escala industrial, e o material, assim como o bagaço do vinho, é constituído de cascas e sementes de uva.

Cabe ressaltar que não foi possível adquirir as duas matérias-primas (BV e BS) no mesmo ano, como seria o ideal. A definição do fornecedor de BS ocorreu apenas em março de 2005, ou seja, após o período de colheita. Como a colheita é anual, foi necessário aguardar o ano seguinte para receber o material. Contudo, procedimentos para minimizar possíveis alterações na composição do bagaço do vinho (BV) foram adotados, como desidratação a frio, acondicionamento em embalagens fechadas, manutenção em temperatura de congelamento (-18°C) e abrigo da luz.

Figura 5.2. Bagaço de uva Isabel, resultante da produção de suco de uva.

5.2 Processamento das amostras

Dos 20 kg de bagaço recebidos (de cada variedade de uva), aproximadamente 500 g foram destinados para análise da composição centesimal; o restante foi submetido à desidratação, com a finalidade de se obter uma maior estabilidade do material. A técnica de secagem escolhida foi a liofilização, na qual o produto é submetido à uma pressão negativa (vácuo) de 0,1 mm de mercúrio a -60°C , por um período aproximado de 72 horas. Este procedimento de desidratação é o mais adequado para o material em questão, considerando que alguns compostos fenólicos da uva podem ser decompostos se submetidos a altas temperaturas (HAMAMA e NAWAR, 1991). Em todas as fases deste estudo (desde a desidratação do bagaço até a obtenção dos extratos), a temperatura máxima em que o material foi submetido foi de 60°C , conforme recomendado por LARRAURI *et al.* (1997). A liofilização das amostras foi realizada no Departamento de Tecnologia, Bioquímica e Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

5.2.1 Obtenção da farinha

O material desidratado foi triturado à temperatura ambiente em moedor de café marca Cadence, modelo MDR301.

Para maior homogeneidade no tamanho de partículas da farinha, o bagaço triturado foi submetido à tamisação (ou peneiração) para posterior análise de classificação granulométrica. Foram peneirados 100 g de bagaço durante 10 minutos. Um conjunto de cinco tamises (peneiras com aberturas das malhas: 20, 35, 60, 80 e

100 mesh/Tyler) foi utilizado. Em seguida, as quantidades retidas em cada tamis foram pesadas.

5.2.2 Desengorduramento da farinha

A farinha obtida após a tamisação foi desengordurada com a finalidade de reduzir o teor de lipídios, e desse modo minimizando riscos de oxidação lipídica no decorrer do experimento. O processo de desengorduramento compreendeu os seguintes procedimentos: 100 gramas da farinha foram misturados em 500 mL de hexano; a mistura foi agitada por 120 minutos em banho maria com agitação (marca Marconi, modelo Dubnoff MA 093), sem água e em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a filtração por meio de papel filtro, e o resíduo resultante foi seco em estufa ventilada a 30°C, para completa eliminação do solvente.

As matérias-primas para o desenvolvimento deste estudo, ou seja, farinha do bagaço de uva do vinho e farinha do bagaço de uva do suco foram referidas pelas siglas FBV e FBS, respectivamente.

Até a realização das análises laboratoriais, as farinhas foram armazenadas a temperatura de -18 °C, em frascos de vidro âmbar.

O fluxograma do processamento do bagaço das uvas até a obtenção das farinhas está representado na Figura 5.3.

Figura 5.3. Fluxograma de processamento das matérias-primas.

5.3 Caracterização nutricional das farinhas de bagaço de uva

5.3.1 Composição centesimal

A determinação de umidade, cinzas e proteínas em FBV e FBS foi realizada de acordo com metodologia descrita pela AOAC (1990). O teor de lipídios foi determinado pelo método de BLIGH e DYER (1959), e o teor de carboidratos foi calculado por diferença.

Para conversão de nitrogênio em proteína (micro-Kjeldahl), utilizou-se o fator de conversão 5,75, recomendado para proteínas vegetais (SOSULSKI e IMAFIDON, 1990).

5.3.2 Determinação de fibras

As análises de fibras totais, solúveis e insolúveis na farinha de BV foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz, no Setor de Doces e Amiláceos. Devido a problemas técnicos no laboratório deste instituto, não foi possível dar continuidade às análises. Assim, a determinação de fibras na farinha de BS foi realizada no Laboratório de Propriedades Funcionais dos Alimentos do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP. O método utilizado para ambas as amostras foi o enzimático-gravimétrico (PROSKY *et al.*, 1988), cujos procedimentos estão resumidamente descritos a seguir:

1. Em cadinhos de fundo de vidro sinterizado (capacidade 50 mL/porosidade 40-60 mm) foram adicionados, aproximadamente, 1g de lã de vidro como auxiliar de filtração. O conjunto (cadinho+lã de vidro) foi submetido a queima em mufla a 525⁰C por 5 horas, tratados com solução de HCl $\pm$ 2N por uma noite e lavados com água destilada para então, serem utilizados. Esse procedimento se repetiu a cada nova utilização do material.
2. Os resultados de fibra total e fibra insolúvel, expressos em percentagem na matéria seca, foram obtidos após subtração dos valores de cinzas e brancos (resíduo das provas em branco corrigidos para cinzas e proteína), e subtração

da proteína bruta ($N \times 6,25$), sendo N determinado por destilação em micro-Kjeldahl.

3. Adicionalmente, foi determinada a composição centesimal das amostras conforme as técnicas descritas no AOAC (1993) para umidade, cinzas, proteína bruta ($N \times 6,25$) e extrato etéreo.

5.3.3 Determinação de ácidos graxos

A extração e separação dos lipídios foram realizadas de acordo com MARMER e MAXWELL (1981). Os ácidos graxos foram determinados em amostras de FBV e FBS por meio da saponificação de alíquotas de extrato lipídico da amostra, onde 100 mg de lipídios foram metilados de acordo com o método de METCALFE *et al.*, (1966), sendo o trifluoreto de boro-metanol utilizado como agente esterificante.

Durante as etapas de transesterificação e armazenamento dos ésteres metílicos, foi adicionado nitrogênio gasoso. Os ésteres metílicos foram armazenados em freezer à temperatura de -20°C .

O perfil de ácidos graxos foi realizado em cromatógrafo a gás, marca SHIMADZU, CG-2010, equipado com coluna capilar SP 2560 da SUPELCO (10 m x 0,25 mm x 0,2 μm). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 260°C , respectivamente. A programação da temperatura da coluna foi de 140°C inicialmente, com acréscimo de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até atingir um platô de 240°C , permanecendo nesta

temperatura por 15 minutos. A razão de divisão *split* foi de 1,5. Os resultados foram expressos em % do total de ácidos graxos presentes na amostra.

5.3.4 Determinação de compostos fenólicos

5.3.4.1 Fenólicos totais

A determinação do teor total de compostos fenólicos em FBV e FBS foi realizada através de método colorimétrico, desenvolvido por SINGLETON e ROSSI (1965), adaptada por GENOVESE *et al.* (2003). A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos foi medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 765 nm. Para o cálculo do teor total de compostos fenólicos, utilizou-se a equação obtida através de curva padrão, a partir da relação entre a absorbância e a concentração do padrão utilizado para esta análise, que foi o ácido gálico. O resultado foi então expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG).

5.3.4.2 Interferência do ácido ascórbico

Extratos de vegetais ricos em ácido ascórbico podem levar a uma superestimação dos resultados na determinação de fenólicos totais, como demonstrado por GENOVESE *et al.* (2003). Os autores testaram a interferência do ácido ascórbico através de sua reação com o reagente de Folin em pH ácido, utilizando o método sugerido por SINGLETON *et al.* (1999). Foi demonstrado que a interferência desta vitamina é aditiva e não sinergista. Deste modo, a interferência de

ácido ascórbico no método Folin-Ciocalteu pode ser eliminada através da diferença entre o conteúdo de fenólicos e o teor da vitamina, determinado por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência). Entretanto, concentrações de ácido ascórbico abaixo de 5 μM em extratos vegetais não interferem na quantificação de fenólicos totais (GENOVESE *et al.*, 2003).

Foi então determinado o teor de ácido ascórbico em FBV e FBS em cromatógrafo (HPLC), de acordo com metodologia proposta por ARAKAWA *et al.* (1981). A análise foi realizada no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos).

5.3.4.3 Resveratrol

As amostras de FBV e FBS foram submetidas à análise cromatográfica para quantificação de resveratrol no laboratório de análises químicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Foi utilizado um cromatógrafo HPLC Perkin Elmer equipado com detector UV-VIS e coluna C_{18} de 250 mm de comprimento, 5 μm de diâmetro de partícula e 4,6 mm de diâmetro interno. 20 μL da amostra (FBV ou FBS) diluída em 100 mL de uma solução de etanol:água (70:30) foram injetados e detectados em 306 nm. A análise foi conduzida com eluição isocrática (fluxo de 1,0 mL min^{-1}), empregando-se uma solução aquosa de acetonitrila a 25 %, com pH 3,0, ajustado com H_3PO_4 . Para a quantificação, foi construída uma curva de calibração externa, com concentrações de *trans*-resveratrol variando entre 0,01 a 10,0 $\mu\text{g/g}$.

O procedimento analítico empregado foi descrito por McMURTREY *et al.* (1994).

5.4 Obtenção e avaliação de extratos para o experimento biológico

5.4.1 Obtenção dos extratos

O processo de extração dos compostos de interesse pode ocorrer de diversas maneiras, podendo-se variar tanto o tipo de solvente quanto a metodologia. Assim, foram realizados pré-testes com o objetivo de se avaliar diferentes metodologias para a definição do extrato de bagaço de uva a ser utilizado no ensaio biológico. Todas as análises foram realizadas em triplicata e ao abrigo da luz.

Quatro diferentes métodos com diferentes solventes de extração foram testados, obtendo-se quatro extratos, conforme descrito a seguir.

- Extrato 1: extrato misto (metanol, água e acetona) (LARRAURI *et al.*, 1997): consiste em um método de extração sequencial, conforme descrito a seguir:

- 1º extração: 1,0 g de amostra (FBV ou FBS) foi diluído em uma solução de 40 mL de metanol:água (50:50, v:v); a solução foi então submetida a agitação magnética por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada a 3.000 rpm, por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para balão volumétrico de 200 mL e reservado. O resíduo da centrifugação (precipitado) foi submetido à segunda extração;
- 2º extração: ao precipitado da 1º centrifugação foram adicionados 80 mL de acetona:água (70:30, v:v); a solução foi agitada por 60 minutos (agitação magnética) e centrifugada nas mesmas condições da 1º extração. O sobrenadante obtido foi transferido para o balão volumétrico da 1º extração, ou seja, os sobrenadantes de ambas as

extrações foram misturados e o volume foi completado com água destilada. O extrato foi então transferido para um frasco âmbar e armazenado sob refrigeração.

- Extrato 2: extrato metanólico acidificado com HCl, através de extração sequencial (KAMMERER *et al.*, 2004).

- 1º extração: 0,5 g de FBV ou FBS foram diluídos em 10 mL de solução de metanol com HCl a 0,1% (v/v). A solução foi submetida a agitação magnética por 120 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada (4.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi colhido em frasco âmbar;
- 2º extração: o resíduo da centrifugação foi diluído em 10 mL do mesmo solvente (metanol acidificado com HCl a 0,1%). A solução foi submetida à agitação magnética por 15 minutos e centrifugada (4.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi adicionado ao sobrenadante da extração anterior e armazenado em temperatura de refrigeração.

- Extrato 3: extrato metanólico (ALONSO *et al.*, 2002): 0,5 g de FBV ou FVS foram diluídos em 50 mL de metanol; a solução foi submetida a banho ultrassônico por 15 minutos, seguido de centrifugação (9000 rpm, 15 minutos, temperatura ambiente). A solução foi filtrada em papel filtro e o sobrenadante recolhido em balão volumétrico de 50 mL, e o volume completado com água destilada. O extrato obtido foi transferido em frasco âmbar e armazenado sob refrigeração.

- Extrato 4: extração sequencial com acetato de etila e água (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2001):

- 1º extração: 0,5 g de amostra (FBV ou FBS) foram diluídos em solução de 4,25 mL de acetato de etila e 0,75 mL de água (v:v). A mistura foi submetida à agitação magnética por 5 horas a 60°C. Em seguida, foi filtrado em papel filtro, e o extrato foi colhido em frasco âmbar;
- 2º extração: o resíduo foi retirado do papel filtro e submetido à uma nova extração, em 5 mL de solução de acetato de etila:água, na mesma proporção utilizada na etapa anterior. A solução foi submetida à agitação e filtração, com os mesmos procedimentos da 1º extração. O extrato resultante foi então colhido no mesmo frasco do 1º extrato, e armazenado sob refrigeração.

5.4.2 Teor de sólidos totais dos extratos

O teor de sólidos totais foi determinado através do método gravimétrico (AOAC, 1997), com a finalidade de se avaliar o rendimento dos extratos e obter dados para o cálculo do teor de compostos fenólicos. Os seguintes procedimentos foram adotados:

- 1 mL de cada extrato foi transferido para um vidro relógio previamente tarado, e este foi colocado em estufa à 105°C por 16 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem, sendo esta operação repetida até peso constante. O teor de sólidos totais foi obtido em mg/mL de extrato.

Posteriormente, determinou-se qual seria o extrato mais indicado para ser administrado no experimento animal. Esta determinação se baseou na avaliação dos seguintes dados: 1) maior teor de compostos fenólicos totais e 2) maior capacidade antioxidante. Diversos autores evidenciaram uma forte correlação direta entre o teor de fenólicos e capacidade antioxidante, ou seja, quanto maior o teor de fenólicos totais, maior o potencial antioxidante (BRENNA e PAGLIARINI, 2001; KARAKAYA *et al.*, 2001; HÖNER *et al.*, 2002).

5.4.3 Avaliação analítica dos extratos

5.4.3.1 Quantificação de compostos fenólicos

A determinação do teor total de compostos fenólicos dos quatro extratos foi realizada com a mesma metodologia descrita no item 5.3.4.1

5.4.3.2 Atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos foi utilizado o método do DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil), que consiste na remoção do radical estável, o DPPH[•] do meio de reação pelos antioxidantes da amostra. Este radical, comercialmente disponível, serve como radical oxidável a ser reduzido pelo antioxidante (AH), bem como um indicador para a reação:

O seguinte procedimento foi aplicado (YAMAGUCHI *et al.*, 1998):

1. amostras e padrão (butil-hidroxitolueno - BHT) foram diluídas em metanol para se obter uma concentração de 1 mg/mL, com base no resíduo seco;
2. alíquotas de 750 µL das amostras foram adicionadas a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH[•], na concentração 20 mg/L;
3. o decréscimo na absorbância em comprimento de onda 517 nm (espectrofotômetro da marca Micronal, modelo B 542 – Brasil) foi verificado em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5 minutos e a cada 5 minutos, até 20 minutos);
4. as leituras da absorbância das amostras foram feitas contra os brancos do DPPH[•] (750 µL de metanol adicionado a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH[•]) e das amostras DPPH (750 µL da amostra adicionada a 1,5 mL de metanol) foram preparados;
5. A porcentagem da atividade antioxidante (AA) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% AA = [1 - \frac{\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco da mesma}}{\text{absorbância do branco do ensaio DPPH}}] \times 100$$

5.4.4 Adaptação do extrato para o ensaio biológico

Em função da toxicidade dos solventes que compõem os extratos descritos no item anterior, estes não seriam apropriados para administração aos animais. Assim, após a escolha do extrato, os solventes foram evaporados de modo que restasse apenas água como o único solvente presente no extrato.

A evaporação foi realizada em rotavapor (marca Büchi, modelo 461, RE 111), durante quatro horas a 60°C, ao abrigo da luz – estas condições são preconizadas por LARRAURI *et al.* (1997), para minimizar as perdas de compostos fenólicos termolábeis e fotossensíveis. Antes da evaporação, foram verificados os pontos de ebulição dos solventes (com exceção da água). Constatou-se que a temperatura de 60°C foi adequada, assegurando a obtenção de um extrato com o solvente selecionado, ou seja, a água.

As principais etapas que compreenderam o processo de obtenção do extrato estão representadas na Figura 5.4.

Figura 5.4. Fluxograma de obtenção do extrato para o experimento biológico.

O extrato escolhido foi então acondicionado em frascos âmbar de 20 mL sob atmosfera de nitrogênio e armazenado em temperatura de refrigeração (máximo 10°C), até a realização do ensaio biológico.

5.4.4.1 Determinação da quantidade de extrato

Uma vez definido o extrato, a próxima etapa seria determinar o volume a ser administrado por via intragástrica. Este valor foi calculado com base em outros relatos da literatura recente, cujo foco fosse o estudo dos efeitos da administração de polifenóis da uva em roedores.

5.5 Experimento Biológico

5.5.1 Animais

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT) (protocolo nº 04/07 – Anexo 1), onde se realizou o experimento biológico.

Foram adquiridos hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, da linhagem Golden Syrian, com aproximadamente 30 dias de idade e peso entre 80 a 90 g. Os animais, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), foram alojados em gaiolas individuais com maravalha (Figura 5.5), em ambiente com temperatura controlada de 23°C ± 2°C, sob ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas.

O período do experimento teve duração aproximada de cinco semanas, incluindo o período de adaptação (aclimatação), que compreendeu uma semana, e período experimental propriamente dito, que durou quatro semanas. Em todas as etapas os animais foram dispostos em gaiolas individuais.

Figura 5.5. Alojamento dos hamsters no biotério, em gaiolas individuais.

A limpeza das gaiolas e a pesagem dos animais foram realizadas uma vez por semana.

5.5.1.1 Coleta de material biológico

Na véspera do sacrifício dos animais, a ração foi retirada às 18 horas, para que estes fossem submetidos a um período de jejum de aproximadamente 15 horas.

Para a coleta de material biológico (sangue e fígado), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal com os seguintes anestésicos: cloridrato de

cetamina (Dopalen®) e xilazina (Rompum®). As doses administradas foram: 80 mg/kg peso e 8 mg/kg peso de cloridrato de cetamina e xilazina, respectivamente. Antes da coleta de sangue, as seringas foram lavadas com heparina (Liquemine®).

Após a anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca. Em seguida, o abdômen foi aberto por uma incisão na linha média.

O sangue foi colhido em microtubos eppendorf de 2 mL, aos quais foram adicionados 10 µL de heparina previamente. Imediatamente após a coleta nos tubos, estes foram mantidos sob temperatura de refrigeração, em maleta térmica com gelo. As amostras foram centrifugadas a 1500 x g, por 15 minutos à 4° C. O sobrenadante (plasma) foi então colhido para as análises de perfil lipídico e inibição da oxidação de LDL-colesterol.

Após a coleta de sangue, o fígado foi perfundido com 20 mL de solução salina (NaCl 0,9%) pela veia porta, para remover o excesso de sangue. Em seguida, foi acondicionado em papel alumínio e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi armazenado a -80° C (em *ultrafreezer*), até a realização das análises.

5.5.2 Dietas

Ao longo do período experimental (incluindo a fase de aclimação), dieta e água foram fornecidas *ad libitum*.

O consumo da dieta foi monitorado diariamente, para avaliar a aceitação e a quantidade consumida. O consumo médio diário de água foi calculado pela

diferença entre a quantidade inicial e a final fornecida no bebedouro, após o período de uma semana.

5.5.2.1 Composição das dietas

Na etapa inicial (período de aclimação), os animais receberam dieta comercial (marca Nuvilab® CR1), na qual a composição dos nutrientes é estimada (Tabela 5.1). Após este período, os mesmos foram aleatoriamente divididos em grupos, de acordo com o tipo de dieta fornecida.

Tabela 5.1. Composição da ração comercial Nuvilab® CR1 fornecida no período de aclimação.

Componente	Quantidade
Umidade	máximo de 12,5%
Proteínas	mínimo de 22,0%
Extrato etéreo	mínimo de 4,0%
Material mineral	máximo de 10,0%
Matéria fibrosa	máximo de 8,0%

A composição das dietas fornecidas na fase principal do ensaio biológico (Tabela 5.2) foi calculada com base na dieta padrão AIN-93G, recomendada para roedores (REEVES *et al.*, 1993). Nesta recomendação, preconiza-se que os micronutrientes devem ser supridos pela adição de uma mistura (*mix*) específica de vitaminas e minerais. As dietas desta fase foram produzidas pela empresa Nutri Experimental, especializada em insumos alimentares para animais de laboratório.

A única diferença na composição entre as dietas controle e a hiperlipemiante consistiu no tipo de lipídio. Na ração hiperlipemiante, substituiu-se

o óleo de soja por gordura de coco e colesterol. Para induzir hamsters à hipercolesterolemia, diversos estudos utilizaram gorduras saturadas, estando o óleo de coco entre as fontes lipídicas mais comuns, na faixa de 10 a 12% (KOWALA *et al.*, 1994; GAVINO *et al.*, 2000). Quanto ao teor de colesterol, este tem sido adicionado em associação à gordura saturada, na quantidade 0,05 a 0,1% (TERPSTRA *et al.*, 1991). Assim, a dieta hiperlipemiante oferecida aos animais deste estudo foi constituída por 11% de óleo de coco e 0,1% de colesterol.

Tabela 5.2. Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico após o período de aclimação.

Ingrediente	Dieta controle		Dieta hiperlipemiante	
	g/kg dieta	%	g/kg dieta	%
Caseína	200,00	20,0	200,00	20,0
Óleo de soja	111,00	11,1	-	-
Gordura de coco	-	-	110,00	11,0
Colesterol	-	-	1,00	0,1
Celulose	50,00	5,0	50,00	5,0
Amido de milho	483,50	48,3	483,50	48,3
Sacarose	100,00	10,0	100,00	10,0
Mix de minerais*	40,00	4,0	40,00	4,0
Mix de vitaminas*	10,00	1,0	10,00	1,0
L-Cistina	3,00	0,3	3,00	0,3
Bitartarato de Colina	2,50	0,3	2,50	0,3
TOTAL	1000,00	100,0	1000,00	100,0

*REEVES, 1993.

5.5.2.2 Preparação das dietas

As dietas foram recebidas em pó, para serem reconstituídas com água destilada, procedimento este realizado no laboratório de Bromatologia (Faculdade de Saúde Pública/USP). Após adição de água na proporção de 50 mL de água para 100 g de pó, a mistura foi homogeneizada com colher. Em seguida, a massa foi disposta

em formas de gelo e armazenada em *freezer* (-18°C) por aproximadamente 2 horas. A preparação foi então retirada das formas, colocada em sacos plásticos e armazenada na mesma temperatura (-18°C), até o momento de ser oferecida aos animais.

5.5.2.3 Perfil lipídico das dietas

Em função da importância do teor lipídico (quantidade e qualidade) das rações, tanto a ração controle quanto a hiperlipemiante foram submetidas à determinação do perfil de ácidos graxos, cuja metodologia é a mesma descrita no item 5.3.3.

A quantificação de colesterol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo da marca Shimadzu SCL-10A-VP, com detector por arranjo de diodo e software de análise Class-VP. Os lipídeos das amostras foram extraídos em coluna seca (MARMER e MAXWELL, 1981), saponificados e extraídos conforme recomendações de BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA (2001). Tomaram-se 5 mL da fração extraída, evaporou-se com nitrogênio, e ressuspendeu-se em 800 µL de hexano grau cromatográfico. A coluna analítica usada foi de fase normal Hypersyl-CPS (25 cm x 4 mm e recheio de 5 µm). O padrão 5-colestano-3-β-ol da Sigma foi empregado para compor a curva padrão. A identificação do colesterol foi baseada no tempo de retenção e comparação com espectro de absorbância obtido pelo detector conjunto de diodos do padrão, com isso fazendo correções necessárias para alcançar pureza mínima do pico de 97%. O volume de injeção foi de 10 µL, e a fase móvel empregada foi constituída por uma

mistura de n-hexano/isopropanol (97:3) com fluxo isocrático de 1 mL/min, como descrito por CSALLANY *et al.* (1989).

5.5.3 Administração dos extratos de BV e BS (EV e ES)

Em modelos experimentais com roedores, soluções líquidas contendo compostos bioativos podem ser administradas pelo menos por três técnicas diferentes:

1) diluição do extrato na água que é fornecida aos animais, monitorando-se o volume consumido. Esta técnica foi empregada por MARTINELLO *et al.* (2006), que avaliaram os efeitos biológicos de extrato de polpa de tamarindo em hamsters; entretanto, esta técnica pode ser imprecisa devido à possibilidade de perda de líquido pelo recipiente durante a manipulação das gaiolas, ou mesmo pelo próprio animal, que pode expelir parte do conteúdo ingerido na ausência de monitoração;

2) administração do extrato por injeção intraperitoneal. KASDALLAH-GRISSA *et al.* (2007) empregaram este método para investigar o efeito do resveratrol após indução de estresse oxidativo em ratos. Os autores argumentam que esta técnica é a mais eficaz para a investigação do metabolismo alcoólico – o extrato administrado continha 35% de etanol na solução .

3) fornecimento por gavagem, que consiste na administração intragástrica do extrato através da introdução de uma cânula por via oral até o estômago. Em geral, esta cânula é constituída por material metálico inoxidável e confeccionada sob medida, cujos diâmetro e comprimento variam de acordo com o

tamanho do animal. Esta técnica requer um treinamento prévio pelo pesquisador ou pessoa designada para administrar o extrato.

Comparando-se com a primeira técnica, a técnica da gavagem envolve um grau muito maior de dificuldade, pois além de demandar treinamento prévio, representa uma considerável fonte de estresse para os animais. É conhecido o fato de que hamsters, em relação aos ratos, são mais estressados, particularmente os hamsters jovens. Apesar disso, a técnica por gavagem foi a escolhida para avaliar o efeito biológico dos extratos (EV e ES). Indubitavelmente, a administração por gavagem ou por injeção intraperitoneal possibilita maior controle e maior exatidão na quantidade administrada – consequentemente, os resultados serão mais confiáveis. A técnica da injeção intraperitoneal foi descartada por envolver um grau de estresse muito elevado aos animais, quando há outra igualmente eficiente e menos estressante. Além disso, esta técnica parece ser indicada na presença de substância alcoólica como um dos componentes do extrato. Em estudos com roedores, a técnica da gavagem parece ser a mais utilizada atualmente (KOGA *et al.*, 1999; CUI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2006; SUTRA *et al.*, 2007).

A gavagem foi executada diariamente durante todo o período experimental, na sala de procedimentos operacionais do biotério, no horário entre 14 e 15 horas, com o auxílio de um funcionário treinado, cujo cargo era tratador de hamsters. A cânula utilizada foi adquirida com as seguintes medidas: 1,2 mm de diâmetro e 5 cm de comprimento. Para a administração do extrato, a cânula foi conectada a uma seringa descartável de 5 mL (Figura 5.6). Após a realização da gavagem, os utensílios foram lavados com água destilada e higienizados com álcool 96°GL.

Figura 5.6. Cânula de gavagem acoplada em seringa, utilizada no experimento biológico.

Levando-se em conta que o estresse envolvido no processo de gavagem (Figura 5.7) pode gerar consequências metabólicas, este procedimento foi aplicado em todos os grupos do experimento, nas mesmas condições, sendo o extrato de uva substituído por água destilada para os demais grupos. Deste modo, eliminou-se um possível fator de confusão que poderia prejudicar a interpretação dos resultados.

Figura 5.7. Administração de extrato de bagaço de uva por gavagem.

5.5.4 Experimento Piloto

Com a finalidade de testar a ração na capacidade de induzir os animais à hipercolesterolemia, foi realizado um experimento piloto, no qual 10 hamsters foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 5: o grupo controle (C) e o grupo hipercolesterolêmico (H), que receberam ração controle e ração hiperlipemiante, respectivamente.

A formulação da dieta para induzir hipercolesterolemia se baseou em estudos anteriores com roedores e dietas hiperlipídicas (FERNANDES *et al.*, 1999; LUCAS *et al.*, 2001).

5.5.5 Experimento Principal

Sessenta hamsters foram aleatoriamente divididos em seis grupos, de acordo com o tipo de ração fornecida (10 animais por grupo), conforme descrito a seguir.

1. Grupo controle (C): dieta com 11,1% de óleo de soja ;
 2. Grupo hipercolesterolêmico (H): dieta hiperlipemiante, com 11% de gordura de coco e 0,1% de colesterol;
 3. Grupo extrato de bagaço de uva do vinho (EV): dieta hiperlipemiante com administração diária de 4 mL/100 g peso (do animal) de EV, por gavagem (Figura 5.7). Esta quantidade foi determinada com base no teor de compostos fenólicos totais, e corresponde a 10,4 mg de compostos fenólicos (em equivalentes de ácido gálico) por 100 g de peso do animal.
- Em outros estudos com roedores e componentes da uva, a dose de extrato

administrada variou de 50 a 100 mg de polifenóis/100 g de peso do animal (KOGA *et al.*, 1999; CUI *et al.*, 2002; MURTHY *et al.*, 2002).

4. Grupo extrato de bagaço de uva do suco (ES): dieta hiperlipemiante com administração diária de 1,9 mL/100 g peso de ES por gavagem – esta quantidade de extrato equivale ao mesmo teor de fenólicos administrados para o grupo EBV, ou seja, 10,4 mg/100 g de peso do animal;
5. Grupo bagaço de uva do vinho (BV): dieta hiperlipemiante com 20% de farinha de BV (FBV) adicionada à ração;
6. Grupo bagaço de uva do suco (BS): dieta hiperlipemiante com 20% de FBS adicionada à ração.

Os componentes do bagaço de uva foram administrados na forma de extrato, denominados grupos EV e ES, e na forma de suplementação à ração – grupos BV e BS. A finalidade desta diferenciação foi comparar a capacidade de modificação do perfil lipídico sanguíneo e atividade antioxidante (inibição da oxidação das LDL-c e enzimas antioxidantes no tecido hepático) nas amostras biológicas entre as duas formas de administração dos bagaços. Os extratos deverão contribuir com o teor relativamente superior de compostos fenólicos em relação às farinhas de bagaço misturadas à ração. Por outro lado, a ração suplementada com as farinhas apresenta teores significativos de fibras, além dos compostos fenólicos presentes na matéria-prima.

A composição da ração dos grupos 3, 4,5 e 6 foi a mesma do grupo 2, com a única diferença de este último grupo ter recebido apenas dieta hiperlipemiante.

Os procedimentos operacionais, condições climáticas e período do experimento, tanto para o piloto quanto para o experimento principal foram os mesmos descritos nos itens 5.5.1 e 5.5.2.

5.5.6 Determinação do perfil lipídico no plasma

Colesterol total (CT), frações de colesterol (HDL-c, LDL-c e VLDL-c) e triglicerídios (TG) foram quantificados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Para a aprovação da realização destas análises, o projeto desta pesquisa foi submetido à avaliação pela Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP. O protocolo foi aprovado e registrado sob nº 348 (Anexo 2).

Foi utilizado analisador bioquímico (Modular P 800, marca Roche®) para a realização destas análises, por metodologia enzimática colorimétrica adaptada de ABELL *et al.* (1958), na forma de *kits* de reagentes da Roche®.

Os valores de LDL-c e VLDL-c foram somados e expressos como colesterol não-HDL. Este padrão foi adotado uma vez que a relação de lipídios em lipoproteínas de hamsters pode não ser a mesma que em humanos, cujos valores de colesterol LDL e VLDL são calculados segundo a equação de Friedewald (FRIEDEWALD, 1974). Como esta equação pode não ser aplicável em hamsters, a fração de colesterol não-HDL foi obtida pela subtração do teor de colesterol HDL, do colesterol total (WOLLIN *et al.*, 2004), ou seja:

$$\text{não-HDL-c} = \text{LDL-c} + \text{VLDL-c} = \text{CT} - \text{HDL-c}$$

5.5.7 Avaliação da capacidade de inibição da oxidação das LDL

O método de HAVEL *et al.* (1955) foi empregado para isolar as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes no plasma dos animais. Este método consiste na ultracentrifugação do plasma (20.000 x g por 24 horas, em temperatura ambiente) em gradiente descontínuo de densidade. Em seguida, as LDL são dialisadas em solução de tampão fosfato (PBS, pH = 7,4) contendo EDTA, esterilizadas em filtro 0,22 µm e armazenadas sob refrigeração (7 a 10°C) até o momento da análise, que foi realizada no laboratório de lípidos da Faculdade de Medicina da USP. A quantidade necessária de plasma para esta análise é de 4 mL – para se obter esta quantidade, seria necessário coletar aproximadamente 10 mL de sangue por animal. Entretanto, isto não é possível, em se tratando de hamsters jovens (com aproximadamente 2 meses) – a quantidade máxima de sangue coletado de um animal foi de 5 mL, que resulta em 2 a 3 mL de plasma após a centrifugação. Assim, para compor os 4 mL, foi feito um *pool* de plasma de 3 a 4 animais.

A avaliação da capacidade dos componentes do plasma em inibir a oxidação das LDL foi realizada conforme descrito por ESTERBAUER *et al.* (1989), como segue:

- As LDL-c (depois de isoladas e dialisadas) das amostras foram diluídas de modo a se obter uma concentração de 40 µg de proteína de LDL-c em 500 µL de PBS (tampão fosfato, pH=7,4), sendo as alíquotas colhidas diretamente nas cubetas de quartzo, para leitura em espectrofotômetro a 234 nm, a 37°C. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951);

- Adicionou-se 1 mL de solução de CuSO_4 15 $\mu\text{mol/L}$. O branco consistiu de 500 μL de PBS e 1 mL de solução de CuSO_4 . A reação foi iniciada imediatamente após a adição de CuSO_4 ;
- A cinética de formação de dienos conjugados foi determinada pela variação na absorbância em intervalos de 3 minutos, monitorada continuamente por 4 horas;
- O tempo de resistência (em minutos) das LDL-c à oxidação (*lag time*) foi calculado entre o início da reação e a intersecção do tempo com a reta extrapolada da fase de propagação.

O *lag time* de oxidação das LDL-c representa o tempo em que as lipoproteínas resistem à oxidação. Assim, quanto maior o *lag time*, maior é o tempo que as lipoproteínas resistiram à oxidação, ou seja, é diretamente proporcional à proteção de antioxidantes presentes na amostra.

5.5.8 Preparo do homogenato do tecido hepático

Fragmentos de 1 g de fígado (de cada amostra) foram homogeneizados em baixa velocidade em homogeneizador Turrax (Marconi, MA-102) com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH = 7,0), em volume correspondente a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 1.010 x g por 20 minutos, a 4° C. Foi colhido 1 mL do sobrenadante em microtubos eppendorf para nova centrifugação (11.200 x g, 20 minutos, 4° C). O novo sobrenadante foi colhido, misturado em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH = 7,0) e submetido à ultracentrifugação (30.000 rpm por 60 minutos, a 4°C).

Assim, obteve-se a fração citosólica para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático. O sobrenadante foi colhido em microtubos com tampa rosqueada e armazenados à -70°C até o momento da análise.

Este método foi descrito por STOCKS *et al.* (1974), e proposto por LISSI *et al.* para avaliação da atividade antioxidante.

5.5.9 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas no homogenato de fígado foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), no qual utilizou-se albumina bovina sérica (BSA) como padrão, empregando-se os seguintes procedimentos:

- Preparo da curva padrão: 200µL de BSA foram diluídos em água deionizada para se obter uma solução na concentração de 2mg/mL. A partir dessa solução, as demais concentrações (1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL e 0,125mg/mL) foram obtidas para compor a curva padrão;
- Preparo das amostras: 10µL de homogenato foram diluídos em 990 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH=7,0). Desta solução, 100 µL foram transferidos diretamente para as cubetas de acrílico (de 1 mL), às quais foram adicionados 900 µL de água deionizada;
- Às cubetas contendo as amostras foram adicionados 100 µL de reagente de Bradford, e após aguardar 10 minutos, a absorbância foi lida a 595 nm.

5.5.10 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

5.5.10.1 Superóxido dismutase

O método descrito por FLOHÉ e GÜNZLER (1984) é baseado na inibição da reação entre o composto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (INT) e o radical superóxido, que originam um composto de coloração avermelhada. O papel da superóxido dismutase (SOD) é acelerar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. A metodologia emprega o sistema xantina e a xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$) através da seguinte reação:

Por sua vez, os radicais superóxido reagem com INT, gerando um composto vermelho, o corante formazan.

A superóxido dismutase, quando presente na amostra, irá competir com o composto INT pelos radicais superóxido, inibindo desta forma a produção do corante.

A atividade de SOD é então medida pelo decréscimo da formação do corante a 505 nm.

5.5.10.2 Glutathione peroxidase

O método é baseado na metodologia descrita por PAGLIA e VALENTINE (1967), na qual a glutathione peroxidase catalisa a oxidação da glutathione pelo hidroperóxido de cumeno (ROOH). Na presença da glutathione reductase (GR) e NADPH a glutathione oxidase (GSSG) é imediatamente convertida na forma reduzida, com uma oxidação concomitante da NADPH a NADP^+ , como descrito abaixo.

Onde:

GR = glutathione reductase

GPx = glutathione peroxidase

GSH = glutathione

ROOH = hidroperóxido de cumeno

ROH = peróxido de cumeno

GSSG = glutathione oxidada

A concentração de GPx é medida pelo decréscimo na absorbância a 340 nm, devido à oxidação do NADPH a NADP^+ .

A atividade enzimática da SOD e GPx no tecido hepático foi realizada em analisador bioquímico, marca Cobas Mira Plus CC (Roche®), no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Foram utilizados *kits* comerciais contendo os reagentes descritos nos itens 4.5.10.1 e 4.5.10.2. Para análise de SOD, foi utilizado o *kit* RANSOD (SD 125), e o *kit* RANSEL (RS 506) foi empregado para determinar a atividade de GPx. Estes *kits* são próprios para utilização em analisadores bioquímicos, e foram adquiridos pela RANDOX Laboratories (Crumlin/UK).

5.5.10.3 Catalase

A metodologia empregada (AEBI, 1984) se baseia na quantificação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima, mediante o decréscimo da densidade ótica a 230 nm. O consumo de H_2O_2 pode ser utilizado como uma medida de atividade da catalase, uma vez que a taxa de decomposição do H_2O_2 é diretamente proporcional à atividade da enzima. Esta medida representa o consumo do peróxido de hidrogênio em micromoles por minuto.

Segundo AEBI (1974), o ensaio pode ser realizado na faixa de temperatura de 0 a 37° C, mas recomenda que seja conduzido em temperaturas próximas a 20°C. Neste estudo, padronizou-se a temperatura de 25°C.

Para o preparo do meio de reação, uma alíquota de 60 μ L de H_2O_2 (peridrol 30%) foi colhida em balão de 100 mL, adicionando-se em seguida água miliQ para completar o volume (q.s.p). Em um frasco âmbar, 90 mL de peridrol

diluído foram misturados a 5 mL de tampão Tris (Sigma®) 1M EDTA, 5mM (pH=8,0) e 4 mL de água miliQ.

Em microtubos Eppendorf, a amostra (homogenato de fígado) foi diluída em tampão fosfato (0,1 M, pH=7,0) a 1:50 (10 μ L de amostra + 490 μ L de tampão). Desta solução, outras duas diluições foram preparadas: 2955 mL do meio + 45 μ L de amostra e 2940 mL do meio + 60 μ L de amostra. Ou seja, para cada amostra são necessárias duas diluições e, portanto, duas leituras. Após adicionada a amostra ao meio de reação em cubetas de quartzo, a leitura das absorbâncias no tempo zero (t_0) foi imediatamente obtida, e também a cada minuto, totalizando um período de seis minutos (t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5).

A quantificação da atividade da catalase é expressa em unidades por minuto por grama (U/min/g) de proteína existente na amostra.

O esquema geral do protocolo experimental é apresentado na Figura 5.8.

Figura 5.8. Esquema do protocolo do ensaio biológico (modelo animal).

5.6 Desenvolvimento e caracterização de preparações com FBV e FBS

5.6.1 Desenvolvimento de picolé e *sorbet*

Para a avaliação do desempenho das farinhas no aspecto sensorial, foram realizados testes de receitas em parceria com a empresa Food Intelligence Consultoria Técnica em Alimentos Ltda.

Os testes iniciais e as preparações foram realizados na cozinha experimental da empresa. Entre as preparações testadas, deu-se preferência àquelas que não utilizassem altas temperaturas, de modo a preservar os compostos fenólicos termolábeis (LARRAURI *et al.*, 1998). Assim, a partir de uma planta piloto, *sorbets* e picolés foram preparados com FBV e FBS, conforme fluxogramas apresentados nas Figuras 5.9 e 5.10. As preparações foram desenvolvidas por profissionais especializados em cozinha experimental, e as receitas foram compostas a partir de adaptações de outras receitas de sorvetes previamente testadas na empresa.

Equipamentos e utensílios próprios para elaboração de sorvetes foram utilizados. Após o acondicionamento em embalagens individuais, os produtos foram armazenados em *freezer* (-18°C) até a realização da análise sensorial.

Figura 5.9. Fluxograma de produção de *sorbet*.

Figura 5.10. Fluxograma de produção de picolés.

5.6.2 Análise microbiológica das preparações

Como uma medida de segurança, os produtos acabados (*sorbets* e picolés) foram submetidos à análise microbiológica. Os parâmetros avaliados foram: contagem padrão em placas; bolores e leveduras; coliformes fecais (UFC); coliformes totais (UFC); *salmonella* sp. Os laudos das análises foram baseados nos limites estabelecidos para sorvetes, disponíveis no Anexo 3 (BRASIL, 2001).

As análises foram realizadas no Laboratório de análises físico-químicas e microbiológicas da mesma empresa que desenvolveu os produtos. Foram empregadas as metodologias preconizadas pela *American Public Health Association* (APHA, 2000).

5.6.3 Análise de cor

A caracterização da cor no *sorbet* e picolé de FBV e FBS foi realizada em triplicata, através da medida dos parâmetros de cor e das curvas de reflectância espectral das superfícies por meio de um espectrofotômetro (Color Quest II, Hunter Lab, USA). Foram estabelecidos os parâmetros: ângulo de observação 10° e iluminante padrão D65, que corresponde a luz natural do dia. O espaço de cor da Hunter Lab foi utilizado para medir a luminosidade ($L^*=0$ para o preto e $L^*=100$ para o branco), a oposição vermelho/ verde ($+a^*$ para verde e $-a^*$ para vermelho) e a azul/ amarelo ($+b^*$ para o amarelo e $-b^*$ para o azul). Croma (C^*) e o ângulo de tom (h^*) foram determinados através das fórmulas: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$.

Foi também comparada a diferença total de cor (ΔE^*_{ab}) entre os picolés de FBV e FBS e um picolé comercial (sabor de uva). Esta diferença foi calculada de acordo com FERREIRA (1981), através da seguinte fórmula:

$$\Delta E^*_{ab} = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2}$$

Onde:

$$\Delta L^* = L^*_1 - L^*_2$$

$$\Delta a^* = a^*_1 - a^*_2$$

$$\Delta b^* = b^*_1 - b^*_2$$

5.6.4 Análise sensorial

O protocolo de análise sensorial foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (Anexo 4). Antes da degustação, foi distribuído o termo de consentimento livre e esclarecido aos degustadores (Anexo 5).

A análise sensorial dos produtos foi conduzida no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP, no período da manhã (9:30 às 10:30 h).

Quarenta e três pessoas adultas, voluntárias e não treinadas participaram do teste. A população de degustadores consistiu de estudantes, professores e funcionários da Faculdade de Saúde Pública da USP. Os recursos de comunicação utilizados para divulgar o evento foram pôsteres e *internet*.

Os atributos sensoriais foram avaliados em condições controladas, ou seja, cabines isoladas, luz fluorescente e fornecimento de água para neutralizar o paladar entre as degustações. A ordem de apresentação para a degustação das amostras foi

aleatória, e as amostras foram identificadas por códigos, segundo proposto por MACFIE *et al.* (1989).

Foram avaliados os seguintes atributos: cor, textura, *flavor* (=sabor e aroma) e aceitação global, aplicando-se o método afetivo de escala hedônica, estruturada mista, de 9 pontos, proposto por PERYAM e GIRARDOT (1952). Neste método, a escala de valores varia de 1 para “desgostei extremamente” até 9 para “gostei extremamente” (Anexo 6). Os valores apontados pelos degustadores que estivessem entre 6 a 9 foram considerados como aprovados. Este critério se baseou no mesmo adotado por MUÑOZ *et al.* (1992), os quais concluíram que estes são os limites de aceitação para um produto de qualidade comercial.

As preparações foram também submetidas ao teste de preferência, em que é solicitado ao provador que indique, após a degustação, qual a amostra preferida. Neste teste, somente duas amostras foram oferecidas por vez, ou seja, picolé de BV e BS ou *sorbet* de BV e BS (Anexo 7).

5.7 Análise estatística

A análise de todas as informações coletadas foi inicialmente feita de forma descritiva. Para as variáveis de natureza quantitativa foram calculadas algumas medidas-resumo, como média e desvio-padrão, e confeccionados gráficos do tipo boxplot (BUSSAB e MORETTIN, 2006).

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram a Análise de Variância Simples (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey (NETER *et al.*, 1996). A transformação logarítmica foi utilizada quando a suposição de igualdade de variâncias (homocedasticidade) entre os grupos não foi satisfeita.

Com relação à avaliação sensorial, foram aplicados os seguintes instrumentos para análise dos resultados: teste *T-Student* para a avaliação de aceitação pela escala hedônica e teste de probabilidade binomial para a avaliação de preferência.

Os dados foram digitados em planilhas do *Excel 2000 for Windows* e as análises estatísticas foram realizadas com o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 11.0 for Windows.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização da matéria-prima

6.1.1 Granulometria das farinhas

Os caules do bagaço foram retirados antes da padronização de partículas, de modo que restassem somente casca e semente de uva. Em valores percentuais sobre o peso seco do bagaço, os caules constituíam a menor fração (aproximadamente 2%), enquanto casca e sementes representaram os 98% restantes (casca = 52%; sementes = 46%). Esta composição está em concordância com a encontrada por LARRAURI *et al.* (1996a).

Após o processo de tamisação do bagaço em peneiras com cinco diferentes aberturas de malhas (20, 35, 60, 80 e 100 mesh/Tyler), verificou-se que a maior quantidade de farinha foi obtida pela peneira de malha 35 mesh. Este resultado foi obtido em ambas as variedades de uva. Assim, padronizou-se o tamanho da partícula das farinhas (Figura 6.1) pelo tamis de 35 mesh (ou Tyler), que corresponde à abertura < 0,42 mm.

Figura 6.1. Farinhas de bagaço de uva do vinho (FBV, à esquerda) e do suco (FBS, à direita).

A visível diferença na coloração entre as farinhas reflete a diversidade no perfil de compostos fenólicos, que são responsáveis pelos aspectos sensoriais, inclusive a cor, característicos de cada variedade (MAXCHEIX *et al.*, 1990).

Quanto ao rendimento em relação à matéria-prima original, constatou-se que 1 kg de bagaço de uva íntegro (*in natura*) rende aproximadamente 375 g de farinha processada.

6.1.2 Composição centesimal

Os dados de composição das duas farinhas (FBV e FBS) estão apresentados na Tabela 6.1. De um modo geral, estes valores estão próximos aos encontrados em outros estudos com bagaço de uva (MARTIN-CARRON *et al.*, 1997; SAURA-CALIXTO, 1998; SHRIKHANDE, 2000).

Tabela 6.1. Composição centesimal, em base seca, lipídica em farinhas de bagaço de uva do vinho (Cabernet Sauvignon) e do suco (Isabel).

Componente	FBV (% média $\pm$ DP)	FBS (% média $\pm$ DP)
Umidade	4,4 $\pm$ 0,50	9,8 $\pm$ 0,34
Cinzas	6,6 $\pm$ 1,30	5,3 $\pm$ 0,19
Proteínas	13,6 $\pm$ 0,17	9,4 $\pm$ 0,29
Lipídios	8,9 $\pm$ 0,24	10,0 $\pm$ 0,40
Fibras totais	64,1 $\pm$ 3,4	49,5 $\pm$ 7,2
Fibras solúveis	3,4 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 2,1
Fibras insolúveis	60,7 $\pm$ 2,2	41,7 $\pm$ 7,2
Carboidratos*	6,8	25,8

* Calculado por diferença (NIFEXT). FBV= farinha de bagaço do vinho; FBS= farinha de bagaço do suco; DP=desvio padrão.

Em particular, o teor de fibras se destaca em relação aos demais nutrientes. A proporção de 50 a 65% de fibras (em peso seco), leva a considerá-las como os principais componentes das matérias-primas deste estudo, pelo menos em termos

quantitativos. Do total de fibras, FBV apresentou 94,7% de fibra insolúvel (FI) e 5,3% de fibra solúvel (FS); em FBS, os teores foram de 84,2% e 15,8% para FI e FS, respectivamente. VALIENTE *et al.* (1995) quantificaram o teor de fibras em casca de uvas brancas utilizando a espécie vinífera *Airén*, comumente empregada para a produção de vinhos brancos na Espanha. O conteúdo de fibras totais foi de 62,4% (peso seco), sendo 93,1% representados pela fração insolúvel e 6,9% pela fração solúvel, semelhante ao valor encontrado nessa pesquisa. Segundo estes autores, a fração insolúvel é constituída basicamente por celulose e hemicelulose, sendo um menor teor composto por lignina; na fração solúvel predominam as substâncias pécicas.

O expressivo conteúdo de fibras proporciona uma característica bastante peculiar às matérias-primas (FBV e FBS). Vale ressaltar que esta peculiaridade não se relaciona apenas ao aspecto quantitativo, mas também qualitativo. Como mencionado anteriormente (item 2.4.1.1), as fibras do bagaço de uva são estruturalmente diferentes das encontradas em fontes já conhecidas, como cereais e outras frutas. Em 1998, SAURA-CALIXTO descreveu um composto encontrado em bagaço de uvas viníferas, que pode ser considerado como uma nova classe de fibra: a fibra alimentar antioxidante (FAA), assim denominada por estar associada a polifenóis com atividade antioxidante. A FAA está presente nas frações solúveis e insolúveis de fibras alimentares, e subprodutos de uva são particularmente ricos neste composto. Em um texto mais recente, o mesmo autor refere que existem dois tipos de polifenóis associados a fibras: os extraíveis (PE) e os não-extraíveis (PNE). Os primeiros são constituídos, em sua maioria, por flavonóides, procianidinas e ácidos fenólicos, que se solubilizam em fluidos intestinais, e podem ser parcialmente absorvidos no intestino

delgado; sua maior parte é fermentada no cólon. Os PNE são constituídos principalmente por taninos condensados (ou proantocianidinas) de alto peso molecular, insolúveis em solventes aquosos e orgânicos, e uma pequena proporção se degrada por fermentação colônica (SAURA-CALIXTO, 2006).

No que se refere ao conteúdo de carboidratos, há uma expressiva diferença entre FBV e FBS (Tabela 6.1). Fatores como variedade da uva e características do processamento influenciam na composição do bagaço, como citado por TORRES *et al.* (2002). No processamento de vinhos, é conhecido o fato de que os principais açúcares da uva – glicose e frutose – são convertidos em etanol durante a fermentação (RIZZON e MIELE, 2005), o que não ocorre na produção de sucos de uva. Assim, é compreensível que o teor destes carboidratos seja inferior no bagaço resultante da vinificação, e portanto na FBV. A determinação de carboidratos foi obtida pela fração NIFEXT (*Nitrogen Free Extract*), que corresponde ao conteúdo de carboidratos mais digeríveis, ou seja, não incluídos na fração fibra (CHATFIELD e ADAMS, 1940).

Segundo VALIENTE *et al.* (1995), na fração protéica do bagaço de uva predominam os aminoácidos glutamina e ácido glutâmico; leucina e lisina estão presentes em quantidades intermediárias, enquanto cistina e metionina apresentam as menores quantidades. A semente de uva foi retirada, sendo o bagaço constituído apenas pela casca de uva; apesar disso, o conteúdo de proteínas totais foi próximo ao encontrado em FBS e FBV, ou seja, 10,72% (base seca).

Com relação à composição centesimal do bagaço íntegro (não desidratado), os teores de proteínas, lipídios e cinzas das duas variedades de uva foram semelhantes aos da farinha. O percentual de umidade no bagaço íntegro do suco e do vinho variou

entre $60,7 \pm 0,56$ a $62,3 \pm 0,6$, respectivamente. O perfil lipídico de FBV e FBS é discutido no próximo item.

6.1.3 Perfil de ácidos graxos

Como citado anteriormente (item 5.2.2), as farinhas foram desengorduradas antes do ensaio biológico. Assim sendo, o perfil lipídico foi determinado apenas para fins de caracterização e comparação das matérias-primas. Após o desengorduramento, o teor de lipídios totais foi reduzido para 3,5% em FBV (inicial = 8,9%) e 3,6% em FBS (inicial = 10,0%).

Em ambas as farinhas, os ácidos graxos encontrados em maior abundância foram o linoléico, oléico (insaturados), palmítico e esteárico (saturados), conforme apresentado na Tabela 6.2.

Tabela 6.2. Perfil de ácidos graxos (médias $\pm$ desvios-padrão) em FBV e FBS.

Ácido graxo	FBV (% média $\pm$ DP)	FBS (% média $\pm$ DP)
C16:0 (Palmítico)	$10,65 \pm 1,58$	$9,53 \pm 2,14$
C18:0 (Esteárico)	$4,75 \pm 0,89$	$4,46 \pm 1,23$
C18:1 (Oléico)	$14,11 \pm 1,09$	$16,05 \pm 3,01$
C18:2 (Linoléico)	$66,33 \pm 5,01$	$66,15 \pm 6,20$
C18:3 (α – Linolênico)	$1,59 \pm 0,02$	$2,45 \pm 0,48$
C20:0 (Araquídico)	$2,22 \pm 0,09$	$0,55 \pm 0,06$

FBV= farinha de bagaço do vinho; FBS= farinha de bagaço do suco; DP=desvio padrão.

Os cromatogramas referentes à análise dos ácidos graxos em BV e BS encontram-se nos Anexos 8 e 9.

As sementes representam em torno de 15 % do subproduto da vinificação (peso úmido), e são responsáveis pelo maior teor de lipídios no bagaço da uva (GÖKTÜRK BAYDAR e AKKURT, 2001). O elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados tem despertado interesse comercial pelo óleo de semente de uva (CAO e ITO, 2003).

O perfil lipídico em bagaço de uvas viníferas vermelhas foi determinado por BRAVO e SAURA-CALIXTO (1998), que obtiveram resultados semelhantes a FBV e FBS. IZZO e MURATORE (1993) avaliaram o perfil lipídico de sementes de uvas tintas e brancas, e também observaram um alto teor de ácido linoleico nas dez variedades estudadas.

6.1.4 Determinação de compostos fenólicos

6.1.4.1 Fenólicos totais

Como se verifica na Tabela 6.3, o teor total de compostos fenólicos nas matérias primas variou de 1,0% (FBV) a 2,1% (FBS) em peso seco.

Tabela 6.3. Concentração de fenólicos totais em FBV e BVS.

Amostra	Fenólicos totais em base úmida (g/100g/EAG)	Fenólicos totais em base seca (g/100g/EAG)
FBV	0,95 ± 0,01	1,0 ± 0,01
FBS	1,9 ± 0,08	2,1 ± 0,08

EAG=equivalente de ácido gálico; FBV=farinha de bagaço do vinho; FBS=farinha de bagaço do suco.

Segundo CANTOS *et al.* (2002), são considerados boas fontes de compostos fenólicos produtos alimentícios contendo 1,15 a 3,61%. YILMAZ e TOLEDO (2006) determinaram o teor de fenólicos totais em sementes de uva, testando diferentes solventes (etanol, metanol, acetona) – os valores obtidos variaram de 2,8% (etanol + água) a 4% (acetona + água). O teor encontrado em bagaço de uvas vermelhas (variedade manto negro, espécie *Vitis vinifera*) por LLOBERA e CAÑELLAS (2007) foi de 2,6% (em equivalentes de ácido gálico). Os valores de ambos os estudos representam o peso seco do produto.

Considerando que os solventes de extração utilizados representam um fator decisivo na quantificação de polifenóis, é importante ressaltar que os valores expostos na Tabela 6.3 foram obtidos com extrato metanólico, seguindo a metodologia de GENOVESE *et al.* (2003) – ou seja, se além do metanol fossem utilizados também a acetona e etanol como relatado por YILMAZ e TOLEDO, é possível que os resultados fossem mais próximos dos relatados por estes autores.

Na comparação entre FBS e FBV, observa-se que a quantidade de polifenóis em FBS é aproximadamente 105% superior a FBV. Para se compreender esta diferença, o processamento é particularmente importante. Sabe-se que o tempo de processamento do vinho é muito superior ao dispendido na produção do suco de uva. Durante o processamento, o tempo médio de contato da casca e semente com a bebida varia de 12 a 18 horas para vinhos não envelhecidos (JOHNSON, 1999), em contraste com 70 minutos para o suco de uva (40 minutos durante o cozimento e 30 minutos na fase da prensa contínua – informação fornecida pelo fornecedor de FBS). Assim, quanto maior o tempo de contato do mosto com o bagaço, maior é a extração dos componentes para a bebida. Ou seja, no processamento do vinho, os polifenóis são

extraídos em maior quantidade para a bebida, restando menos no bagaço – o contrário ocorre com o suco de uva – o menor tempo de processamento confere um maior teor de fenólicos no subproduto do suco.

6.1.4.2 Interferência do ácido ascórbico

Em ambas as amostras (FBV e FBS), o teor de ácido ascórbico foi abaixo do limite de detecção, ou seja, menor que 0,50 mg/100g, que corresponde a 0,28 μM . Como mencionado no item 5.3.4.2, concentrações de ácido ascórbico abaixo de 5 μM não interferem na quantificação de fenólicos totais (GENOVESE *et al.*, 2003). Deste modo, não foi necessário fazer a correção da concentração de fenólicos totais em FBV e FBS.

6.1.4.3 Resveratrol

A variação na concentração de *trans*-resveratrol em ambas as farinhas foi bastante expressiva, como se verifica na Tabela 6.4 e Figuras 6.2 e 6.3.

Tabela 6.4. Concentração (média $\pm$ desvio-padrão) de *trans*-resveratrol em amostras de FBV e FBS.

Matéria-prima	Concentração (mg/L)
FBV	$< 0,01 \pm 0,001$
FBS	$0,45 \pm 0,01$

FBV=farinha de bagaço do vinho; FBS=farinha de bagaço do suco.

Em FBV, o teor de *trans*-resveratrol foi abaixo do limite de detecção estabelecido na curva de calibração (0,01 a 10,0 µg/g), ou seja, é praticamente nulo, em contraste com o encontrado em FBS.

Figura 6.2. Teor de *trans*-resveratrol em FBV e FBS.

O mesmo argumento apresentado no item anterior (6.1.4.1) vale para justificar a diferença no teor de resveratrol em FBV e FBS. Além disso, fatores relacionados a condições de armazenamento (tempo, umidade, embalagem, temperatura) de produtos contendo polifenóis podem reduzir seu teor, como relatado por SPANOS e WROLSTAD (1990). Considerando que o bagaço do vinho foi adquirido um ano antes do bagaço do suco, uma possibilidade seria a perda de resveratrol em FBV durante este período. Entretanto, segundo outra investigação realizada com bagaço de uva (BERTELLI *et al.*, 1998), este polifenol é relativamente estável, principalmente quando comparado a antocianinas, resistindo a períodos superiores a um ano de armazenamento.

Figura 6.3. Cromatograma da análise: FBV (acima) e FBS (abaixo).

CARERI *et al.* (2003) compararam o perfil de *trans*-resveratrol entre vinhos e bagaço da mesma variedade de uva vinífera, utilizando acetona e água (7:3, v/v/) para a extração. A concentração de resveratrol no vinho foi cinco vezes superior à do bagaço.

Não foi encontrado na literatura estudo comparativo sobre o teor de resveratrol para uvas de espécie vinífera e labrusca.

6.2 Extratos de BV e BS

6.2.1 Sólidos totais, fenólicos totais e atividade antioxidante

Os valores relativos ao teor de sólidos totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante dos quatro extratos de compostos fenólicos estão expostos nas tabelas 6.5 e 6.6 para o extrato de farinha de BV (EV) e extrato de farinha de BS (ES), respectivamente.

O teor de sólidos totais expressa o rendimento dos extratos; diferentes solventes de extração foram utilizados, como descrito no item 5.4.1. Em EV, não houve diferença significativa entre os extratos 1 e 2 nesta variável, ou seja, água, metanol e acetona (método 1) apresentaram rendimento similar ao metanol acidificado com HCl (método 2). Por outro lado, em amostras de ES, o método 1 apresentou valores significativamente superiores em relação aos outros três (Tabela 6.6).

Tabela 6.5. Valores médios $\pm$ desvios padrão de sólidos totais, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de farinha de bagaço do vinho (EV).

Extratos/métodos	Sólidos totais (mg/mL)	Teor de fenólicos totais (mg/mL/EAG)	Atividade antioxidante DPPH (%)
Extrato 1	6,7 $\pm$ 0,40 ^a	0,58 $\pm$ 0,01 ^a	96,1 $\pm$ 2,70 ^a
Extrato 2	4,6 $\pm$ 0,44 ^a	0,25 $\pm$ 0,01 ^b	91,2 $\pm$ 2,42 ^a
Extrato 3	0,9 $\pm$ 0,12 ^b	0,14 $\pm$ 0,02 ^c	77,5 $\pm$ 1,31 ^b
Extrato 4	0,2 $\pm$ 0,06 ^c	0,05 $\pm$ 0,01 ^d	30,9 $\pm$ 1,72 ^c

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). EAG = Equivalente de ácido gálico.

Tabela 6.6. Valores médios $\pm$ desvios padrão de sólidos totais, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de farinha de bagaço do suco (ES).

Extratos/métodos	Sólidos totais (mg/mL)	Teor de fenólicos totais (mg/mL/EAG)	Atividade antioxidante DPPH (%)
Extrato 1	27,7 $\pm$ 1,52 ^a	1,00 $\pm$ 0,07 ^a	91,7 $\pm$ 2,90 ^a
Extrato 2	15,2 $\pm$ 2,14 ^b	0,95 $\pm$ 0,02 ^a	91,7 $\pm$ 2,25 ^a
Extrato 3	8,1 $\pm$ 1,32 ^c	0,13 $\pm$ 0,02 ^b	90,8 $\pm$ 1,85 ^a
Extrato 4	0,3 $\pm$ 0,15 ^d	0,29 $\pm$ 0,03 ^c	85,5 $\pm$ 3,92 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). EAG = Equivalente de ácido gálico.

A concentração de fenólicos totais foi maior no Método 1 tanto para EV quanto para ES, embora a diferença não tenha sido significativa em relação ao Método 2, para ES. Visando comparar o teor de polifenóis em cinco polpas de frutas, KUSKOSKI *et al.* (2006) quantificaram estes compostos, obtendo os seguintes resultados (expressos em mg/100 g EAG, base seca): 1) abacaxi = 21,7 ; 2) cupuaçu = 20,5 ; 3) maracujá = 20,0 ; 4) graviola = 84,3 ; 5) uva = 117,1. Convertendo-se para a mesma unidade de medida, o teor de polifenóis em EV e ES foi de 58,0 e 100,0 mg/100 g EAG, respectivamente – ambos os valores foram obtidos pelo Método 1. Estes achados reforçam a suposição de que a uva é uma das maiores fontes alimentares de compostos fenólicos, como foi observado por MAXCHEIX *et al.*

(1990) e BALASUNDRAM *et al.* (2006). Neste aspecto, as antocianinas são particularmente importantes, pois encontram-se em grandes concentrações principalmente na casca de uvas vermelhas (MUÑOZ-ESPADA *et al.*, 2004).

ABE *et al.* (2007) compararam o perfil de polifenóis e capacidade antioxidante entre uvas de espécies *vinífera* e *labrusca*. Os maiores teores de polifenóis foram encontrados nas uvas da cultivar Folha de Figo (espécie *labrusca*) e Syrah (espécie *vinífera*), não havendo diferença significativa entre ambas. Os autores observaram que o perfil de polifenóis e atividade antioxidante não depende necessariamente da espécie da uva, sendo mais variável de acordo com a cultivar (ou variedade). O resveratrol e camferol, por exemplo, podem estar presentes em uvas vermelhas e ausentes em uvas brancas, independentemente da espécie. O conteúdo de antocianinas também varia entre as cultivares, e está associado à cor da uva – sendo a antocianina o pigmento responsável pela cor vermelha da uva, as cultivares mais escuras apresentam os maiores teores (MAZZA, 1995).

Comparando-se o teor de polifenóis (Tabelas 6.5.e 6.6), verifica-se uma notável diferença entre EV e ES obtidos dos quatro métodos. ES apresentou valores significativamente superiores aos de EV em três deles, e teor semelhante em apenas um método. Esta diferença também foi observada na quantificação de resveratrol (Tabela 6.4). A variabilidade no tempo de processamento das uvas justifica a diferença entre as farinhas. Como a uva Cabernet Sauvignon (matéria-prima da farinha de EV) permanece por mais tempo em contato com a bebida, os compostos fenólicos naturalmente serão extraídos em maior quantidade na bebida (vinho), restando deste modo um menor teor no bagaço.

O extrato 4 apresentou resultados significativamente inferiores aos demais, nas três variáveis. Cabe ressaltar que neste método, JAYAPRAKASHA *et al.* avaliaram a semente de uva, utilizando-se acetato de etila e água como solventes de extração. Como FBV e FBS são constituídos por casca de uva além de sementes, os resultados foram diferentes dos encontrados pelos autores, uma vez que o perfil de polifenóis da casca é bastante diverso do encontrado na semente. Na casca, predominam as antocianinas, que estão ausentes nas sementes – nestas, predominam taninos condensados e proantocianidinas (NEGRO *et al.*, 2003). BONILLA *et al.* (1999) investigaram a extração de polifenóis de sementes de uva para avaliar se é factível sua utilização como aditivo antioxidante em alimentos ricos em lipídios. O solvente mais eficaz na extração de compostos lipofílicos foi o acetato de etila, principalmente quando comparado à água. Isto provavelmente ocorreu devido à maior afinidade do acetato de etila com os lipídios, uma vez que ambos são compostos de baixa polaridade.

JU e HOWARD (2003) constataram que os polifenóis presentes na casca da uva são melhor extraídos com metanol. De fato, este solvente foi que o apresentou os melhores resultados, para ambos os tipos de amostra. No entanto, somente o metanol como solvente parece ser menos eficaz do que sua associação com acetona – isto se verifica quando se comparam os métodos 1 e 3. Em resumo, a combinação de metanol, água e acetona foi a mais eficaz em relação aos demais solventes/métodos. Este dado foi também evidenciado por YILMAZ e TOLEDO (2006), que extraíram polifenóis de sementes de uva muscadine (espécie *Vitis rotundifolia*), os quais concluíram que misturas de etanol, metanol ou acetona com água são mais eficazes do que a utilização de apenas um solvente isoladamente.

Para o cálculo de compostos fenólicos utilizou-se o ácido gálico como padrão (Figura 6.4), o mesmo empregado por KUSKOSKI *et al.* (2006) e ABE *et al.* (2007).

Com relação à atividade antioxidante dos extratos, os três primeiros métodos revelaram uma ótima capacidade em sequestrar o radical DPPH•. A inibição da oxidação variou entre 91,7 a 96,1%, não havendo diferença entre as amostras, com exceção apenas para o extrato do Método 3 em FBV, que inibiu em 77,5% a oxidação da amostra. O método do DPPH se baseia na capacidade do antioxidante transferir elétrons (ou hidrogênio) para o radical livre (DPPH•) que, ao se reduzir, perde sua coloração púrpura. Com base nos dados apresentados, pode-se dizer que os compostos bioativos presentes em EV e ES são capazes de agir como sequestradores de radicais pela capacidade de doar átomos de hidrogênio (SHAHIDI *et al.*, 2007). São vários os

relatos disponíveis na literatura evidenciando as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos da uva, seja ela vermelha ou branca, da espécie *vinífera* ou *labrusca*, com o método DPPH (BAYDAR *et al.*, 2007; PAKHALE *et al.*, 2007) ou outros métodos *in vitro* (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2001; MURTHY *et al.*, 2002; NEGRO *et al.*, 2003; KAWASHIMA *et al.*, 2007).

ABE *et al.* (2007) verificaram uma forte correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante das amostras, fato este já bastante conhecido e divulgado há mais de uma década (FRANKEL *et al.*, 1995; SIMONETTI *et al.*, 1997; BURNS *et al.*, 2000; BRENNA e PAGLIARINI, 2001; KARAKAYA *et al.*, 2001; HÖNER *et al.*, 2002; ISHIMOTO, 2003).

Após a avaliação destes resultados, constatou-se que o Método 1 foi o que obteve o melhor perfil nos três critérios de avaliação estabelecidos. Ou seja, hipoteticamente, seria o mais indicado para ser aplicado no experimento biológico. A tabela 6.7 apresenta a concentração de fenólicos totais deste método em base seca em EV e ES.

Tabela 6.7. Valores médios $\pm$ desvios padrão do teor de fenólicos totais em base úmida e seca em EV e ES, pelo Método 1 (LARRAURI *et al.*, 1996).

Extratos	Sólidos totais (mg/mL)	Fenólicos totais (mg/mL/EAG)	Fenólicos totais (mg/g extrato seco/EAG)
EV	6,7 $\pm$ 0,40	0,58 $\pm$ 0,01	86,6 $\pm$ 2,14
ES	27,7 $\pm$ 1,52	1,00 $\pm$ 0,07	36,1 $\pm$ 0,94

EV=extrato de bagaço do vinho; ES=extrato do bagaço do suco. EAG = Equivalente de ácido gálico.

O teor em peso seco de extrato é menor em ES em função da elevada concentração de matéria seca, ou seja, 27,7 mg/mL, em contraste com 6,7 mg/mL em

EV. Tendo em vista que os extratos brutos com metanol, acetona e água não seriam apropriados para administrar aos animais, a próxima etapa foi então eliminar os solventes orgânicos de modo que restasse apenas água na solução final.

6.2.2 Adaptação do extrato para o ensaio biológico

O método do extrato 1 (LARRAURI *et al.*, 1997) foi adaptado para se obter um produto inócuo aos animais. Com a evaporação dos solventes, houve uma maior concentração do extrato, como era esperado. Para se definir a quantidade de extrato a ser administrada no experimento biológico, seria necessário quantificar novamente o teor de compostos fenólicos, com a mesma metodologia aplicada na etapa anterior (item 5.3.4.1). Como se verifica na Tabela 6.8, houve um considerável aumento no teor de fenólicos totais em relação à concentração inicial (Tabela 6.7). O extrato do bagaço do vinho apresentou uma concentração quase 5 vezes superior em relação ao teor inicial. Para o extrato de bagaço do suco, este aumento foi de 5,6 vezes, indicando que os procedimentos adotados para minimizar a perda de polifenóis nesta etapa foram satisfatórios.

Tabela 6.8. Valores médios $\pm$ desvios padrão do teor de fenólicos totais e base seca dos extratos concentrados para utilização no ensaio biológico.

Extrato	Sólidos totais (mg/mL)	Teor de fenólicos totais (mg/mL/EAG)	Fenólicos totais (mg/g extrato seco/EAG)
EV	12,1 $\pm$ 0,61	2,6 $\pm$ 0,19	215,8 $\pm$ 11,1
ES	66,5 $\pm$ 0,17	5,6 $\pm$ 0,29	84,2 $\pm$ 0,23

EV=extrato da farinha de bagaço do vinho; ES=extrato da farinha de bagaço do suco. EAG = Equivalente de ácido gálico.

Como esperado, o aumento no teor de polifenóis de ES em relação a EV foi proporcional ao resultado obtido anteriormente (Tabela 6.7). A quantidade de polifenóis em um litro de EV (2,6 g) é próxima à encontrada em um litro de vinho tinto brasileiro produzido com uvas viníferas, incluindo Cabernet Sauvignon, cujo teor médio foi de 2,5 g/L (ISHIMOTO, 2003). Esta adaptação trouxe duas vantagens: além de tornar o extrato inócuo, aumentou significativamente seu teor de polifenóis.

6.2.3 Administração dos extratos

A dose de EV e ES a ser administrada aos animais foi padronizada a partir de dados disponíveis na literatura. Quantidades muito variáveis de polifenóis foram fornecidas, via gavagem, em outras pesquisas com roedores. KOGA *et al.* (1999) aplicaram extrato de proantocianidinas da uva contendo 250 mg.kg^{-1} de peso do animal, enquanto CUI *et al.* (2002) utilizaram três doses diferentes: 50, 100 e 200 mg.kg^{-1} de polifenóis da uva – estes constataram que o efeito cardioprotetor foi dose-dependente, ou seja, a maior quantidade foi a que levou ao melhor resultado.

Neste estudo, padronizou-se a dose diária após sucessivos testes durante o experimento piloto, utilizando-se água destilada. Observou-se que volumes de até 4,0 mL/100 g peso do hamster eram bem tolerados. Com o aumento do volume, verificou-se um risco maior de aspiração do líquido, o que poderia acarretar a morte por pneumonia. Assim, padronizou-se o volume máximo de 4,0 mL de extrato por 100 g de peso do animal. Para EV, este volume equivale a 104 mg.kg^{-1} de peso corporal de compostos fenólicos, em equivalentes de ácido gálico (EAG). Este teor de fenólicos corresponde ao volume de 1,9 mL de ES/100 g peso. Deste modo, padronizou-se a

quantidade de 10,4 mg de polifenóis/EAG/100 g peso do animal por gavagem, para ambos os grupos.

6.3 Dietas

Foram preparadas quatro diferentes dietas: 1) controle 2) hiperlipemiante 3) hiperlipemiante com 20% de farinha de bagaço do vinho (FBV) e 4) hiperlipemiante com 20% de farinha de bagaço do suco (FBS). Após a reconstituição com água, verificou-se que as dietas controle e hiperlipemiante apresentaram semelhança na cor (Figuras 6.5 e 6.6), o que não ocorreu entre as dietas com 20% de farinha de uva. A dieta com FBV (Figura 6.7) apresentou cor mais escura em relação à dieta com FBS (Figura 6.8), provavelmente em decorrência das diferenças no perfil de compostos fenólicos entre as matérias-primas.

Figura 6.5. dieta controle.

Figura 6.6. dieta hiperlipemiante.

Figura 6.7. dieta hiperlipemiante com 20% de FBV.

Figura 6.8. dieta hiperlipemiante com 20% de FBS.

6.3.1 Perfil lipídico das dietas

O principal diferencial na composição entre as dietas controle e hiperlipemiante ocorreu na fração lipídica. Assim, determinou-se o perfil de ácidos graxos nas duas dietas (Tabela 6.9).

Tabela 6.9. Perfil de ácidos graxos das dietas controle e hiperlipemiante.

Ácido graxo	Ração Controle (%)	Ração hiperlipemiante (%)
Caprílico (C8:0)	0	4,63 ± 0,91
Cáprico (C10:0)	0	4,14 ± 0,77
Láurico (C12:0)	1,36 ± 0,03	57,74 ± 2,14
Mirístico (C14:0)	0,86 ± 0,02	13,97 ± 1,23
Palmítico (C16:0)	11,53 ± 0,53	6,16 ± 0,91
Esteárico (C18:0)	2,74 ± 0,20	1,64 ± 0,05
Oléico (C18:1 n9)	20,58 ± 0,41	9,85 ± 0,48
Linoléico (C18:2 n6)	56,31 ± 0,37	1,87 ± 0,06
Gama-Linolênico (C18:3 n6)	0,77 ± 0,03	0
Cis-11-Eicosanóico (C20:1)	0,99 ± 0,03	0
Linoleico (C18:2 n6)	4,87 ± 0,49	0
Total saturados	16,49	88,28
Total monoinsaturado	20,58	9,85
Total poliinsaturados	62,93	1,87

Valores apresentados como média ± desvio-padrão; DHA=docosahexanóico.

Os valores relativos à quantificação de ácidos graxos corresponderam ao planejamento do desenho experimental, no qual a ração controle deveria conter acima de 80% de lipídios insaturados e a ração hiperlipemiante acima de 80% de lipídios saturados. Sabe-se que os ácidos graxos láurico e mirístico induzem a hipercolesterolemia endógena em modelos animais, particularmente em hamsters (ALEXAKI *et al.*, 2004) e porquinhos-da-Índia (ZERN *et al.*, 2003).

Os cromatogramas destas análises encontram-se no Anexo 10.

6.4 Experimento Piloto

6.4.1 Peso dos animais, consumo de dieta e água

O experimento piloto foi realizado com o objetivo de se comparar o efeito das dietas do grupo controle (11,1% de óleo de soja) e do grupo hipercolesterolêmico (11 % de gordura de coco e 0,1% de colesterol) sobre o perfil lipídico dos animais. Neste experimento, 10 hamsters foram divididos em 2 grupos de 5. A dieta e a água foram oferecidos *ad libitum* aos animais, e após 1 mês de tratamento foram avaliados os dados relativos ao consumo de ração e água, bem como o ganho de peso (Tabela 6.10).

No que se refere ao consumo de dieta e água, não houve diferença entre os grupos ($p = 0,01$), o que também ocorreu com o coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

Tabela 6.10. Peso inicial e final, ganho de peso, consumo de dieta, água e coeficiente de eficiência alimentar (média $\pm$ desvios-padrão) dos hamsters do experimento piloto.

Variáveis	Grupo controle	Grupo Hipercolesterolêmico
Peso inicial (g)	93,1 $\pm$ 3,63	88,2 $\pm$ 5,63
Peso final (g)	131,4 $\pm$ 10,2	134,3 $\pm$ 17,84
Ganho de peso (g)	38,3 $\pm$ 7,76	46,2 $\pm$ 13,75
Consumo de água (mL/dia)	11,2 $\pm$ 0,23	12,4 $\pm$ 1,49
Consumo de dieta (g/dia, base seca)	10,3 $\pm$ 0,17	9,8 $\pm$ 0,49
CEA (%)	12,0 $\pm$ 1,54	15,2 $\pm$ 2,87

CEA = coeficiente de eficiência alimentar - corresponde ao ganho de peso/consumo de ração (total) x 100.

O consumo de água foi relativamente inferior ao encontrado por outra pesquisa com hamsters, que foi, em média, 17 mL/dia (MARTINELLO, 2006). Esta diferença provavelmente está relacionada ao elevado teor de umidade das dietas deste

estudo, que variou de 36,5% para dieta controle e 39,8% para dieta hipercolesterolêmica. O alto teor de umidade se justifica por ser a dieta reconstituída com água, sem passar pelo processo de peletização. Em geral, o teor de umidade em dietas peletizadas para roedores varia de 7 a 10% (MENDONÇA, 2006; FROTA, 2007).

Com relação ao coeficiente de eficiência alimentar (CEA), o valor encontrado foi similar aos encontrados na literatura (ALIA *et al.*, 2003; MENDONÇA, 2006; FROTA, 2007).

6.4.2 Perfil lipídico plasmático

A concentração plasmática de colesterol total, frações de colesterol e triglicérides é apresentada na Tabela 6.11.

Tabela 6.11. Perfil lipídico em plasma dos hamsters do estudo piloto.

Grupo	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	não HDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
C	98,0 ± 12,39 ^a	75,4 ± 10,1 ^a	22,6 ± 5,77 ^a	76,2 ± 17,91 ^a
H	168,6 ± 25,38 ^b	114,8 ± 14,97 ^b	51,6 ± 15,24 ^b	194,4 ± 96,41 ^b

C=grupo controle; H=grupo hipercolesterolêmico; CT=colesterol total; HDL-c=HDL-colesterol; não-HDL-c=não-HDL-colesterol; TG=triglicérides. Valores apresentados em média ± desvios-padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

A concentração plasmática de colesterol total no grupo que recebeu dieta hiperlipemiante, ou seja, com 11% de gordura de coco + 0,1% de colesterol foi 72% maior em relação ao grupo controle (ração com 11,1% de óleo de soja). Houve um aumento significativo também nos níveis de frações do colesterol (HDL-c e não HDL-c, que representa a soma de LDL-c + VLDL-c). Com relação aos triglicérides, a

diferença foi ainda maior – o grupo hipercolesterolêmico apresentou uma concentração média 154% maior em relação ao grupo controle.

A dieta com gordura de coco e colesterol apresentou efeito hiperlipemiante sendo, portanto, considerada adequada para ser utilizada no experimento biológico principal.

6.5 Experimento Principal

6.5.1 Peso dos animais, consumo de dieta e água

Dieta e água foram consumidas *ad libitum* e, após 1 mês de tratamento, foram avaliados os dados relativos ao consumo de ração e água, bem como o ganho de peso (Tabela 6.12).

Uma preocupação prévia ao experimento biológico foi a possibilidade de ocorrência de diarreia pelo alto teor de fibras nas rações suplementadas com 20% de bagaço de uva. Entretanto, observou-se que não houve alteração na consistência das fezes desde o período de aclimação até o final do experimento.

Tabela 6.12. Peso inicial e final, ganho de peso, consumo de água, dieta e coeficiente de eficiência alimentar (média $\pm$ desvios-padrão) dos hamsters do experimento principal.

Variáveis	Grupos					
	C	H	EV	ES	BV	BS
Peso inicial (g)	94,0 $\pm$ 6,9	91,7 $\pm$ 7,7	78,4 $\pm$ 9,5	95,1 $\pm$ 8,5	70,8 $\pm$ 8,14	71,3 $\pm$ 12,6
Peso final (g)	136,6 $\pm$ 13,7	130,3 $\pm$ 16,9	101,2 $\pm$ 12,1	115,6 $\pm$ 10,8	101,5 $\pm$ 12,3	119,4 $\pm$ 14,2
Ganho de peso (g)	42,6 $\pm$ 9,4	38,6 $\pm$ 14,7	22,8 $\pm$ 9,4	20,3 $\pm$ 8,9	30,7 $\pm$ 9,59	48,1 $\pm$ 5,0
Consumo de água (mL/dia)	10,2 $\pm$ 1,8	10,1 $\pm$ 2,7	9,0 $\pm$ 2,0	10,4 $\pm$ 2,5	8,4 $\pm$ 2,59	8,5 $\pm$ 3,4
Consumo de dieta (g/dia, base seca)	9,8 $\pm$ 0,35	9,3 $\pm$ 0,5	7,3 $\pm$ 2,1	6,4 $\pm$ 3,5	10,5 $\pm$ 2,11	9,7 $\pm$ 1,7
CEA (%)	14,0 $\pm$ 1,9	13,4 $\pm$ 3,1	12,0 $\pm$ 2,8	12,2 $\pm$ 1,9	10,8 $\pm$ 1,69	18,4 $\pm$ 1,4

CEA = coeficiente de eficiência alimentar (ganho de peso/consumo de ração (total) x 100). C=controle; H=hipercolesterolêmico; EV=extrato de bagaço do vinho; ES=extrato de bagaço do suco; BV=ração com 20% de bagaço do vinho; BS=ração com 20% de bagaço do suco.

Os grupos EV e ES, quando comparados aos demais grupos, foram os que apresentaram o menor ganho de peso. Como descrito no item 5.4.4, os solventes orgânicos dos extratos (EV e ES) foram evaporados antes de serem administrados aos animais. Contudo, a certificação do grau de eficácia da remoção dos solventes somente poderia ser obtida através de análise dos extratos, por cromatografia ou espectrometria. Como não foi possível realizar tal análise, a presença de resíduos de metanol, acetona ou outro composto nos extratos é uma possibilidade que pode explicar o menor ganho ponderal nestes grupos. Outra possível justificativa consiste na hipótese da capacidade dos polifenóis da semente de uva em inibir a ação de enzimas envolvidas no metabolismo de gorduras. Em um estudo *in vitro*, MORENO *et*

al. (2003) demonstraram que o extrato de semente de uva inibiu a atividade das enzimas lipase pancreática e lipase lipoproteica, reduzindo a absorção de gorduras e o acúmulo destas no tecido adiposo. Posteriormente, VOGELS *et al.* (2004) evidenciaram, em humanos, que o extrato de semente de uva levou à redução do consumo alimentar, sugerindo que os compostos da semente de uva podem representar uma alternativa no controle de peso.

Quanto ao consumo de água, verificou-se que somente nesta variável houve um resultado homogêneo entre os grupos. Nas demais variáveis, diferenças foram detectadas com relação a ganho de peso e consumo de ração, que interferem no coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

Figura 6.9. Boxplot do coeficiente de eficiência alimentar (%).

BS=ração com 20% de bagaço do suco.; BV=ração com 20% de bagaço do vinho; C=controle; ES=extrato de bagaço do suco; EV=extrato de bagaço do vinho; H=hipercolesterolêmico.

Como se observa na Figura 6.9, não houve diferença significativa no CEA entre a maioria dos grupos, com exceção apenas para o grupo BS, que apresentou a maior média. De forma coerente, este foi também o grupo que apresentou maior ganho de peso.

6.5.2 Perfil lipídico plasmático

O grupo hipercolesterolêmico (H) apresentou concentração plasmática de colesterol total (CT) 69% maior em relação ao grupo controle (C), como exposto na tabela 6.13. Tal resultado comprova o efeito hiperlipemiante dos lipídios da ração fornecida ao grupo H. Com exceção do grupo EV, todos os grupos tratados com os compostos bioativos da uva apresentaram CT significativamente inferior ao grupo H. Embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa, a média do grupo EV foi quase 16% inferior à do ao grupo H.

Tabela 6.13. Média $\pm$ desvios-padrão de colesterol total (CT), HDL-c, não-HDL-c e triglicérides (TG) nos grupos experimentais.

Grupos	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	não HDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
C	94,8 $\pm$ 13,0 ^a	72,2 $\pm$ 10,1 ^a	22,6 $\pm$ 6,1 ^a	81,2 $\pm$ 22,7 ^a
H	160,8 $\pm$ 32,3 ^b	106,1 $\pm$ 18,1 ^b	43,6 $\pm$ 14,9 ^b	189,9 $\pm$ 86,5 ^b
EV	134,8 $\pm$ 20,2 ^b	105,6 $\pm$ 14,2 ^b	29,1 $\pm$ 8,9 ^a	70,9 $\pm$ 40,6 ^a
ES	121,1 $\pm$ 22,9 ^a	93,8 $\pm$ 14,5 ^b	27,4 $\pm$ 9,4 ^a	75,0 $\pm$ 37,5 ^a
BV	118,8 $\pm$ 21,4 ^a	94,6 $\pm$ 17,0 ^b	27,0 $\pm$ 10,0 ^a	77,2 $\pm$ 21,2 ^a
BS	109,5 $\pm$ 13,3 ^a	89,1 $\pm$ 10,1 ^a	20,8 $\pm$ 8,0 ^a	79,5 $\pm$ 18,2 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). C=controle; H=hipercolesterolêmico; EV=extrato de bagaço do vinho; ES=extrato de bagaço do suco; BV=ração com 20% de bagaço do vinho; BS=ração com 20% de bagaço do suco. CT=colesterol total; HDL-c=HDL-colesterol; não-HDL-c=soma das frações LDL+VLDL colesterol; TG=triglicérides.

Os grupos ES, BV e BS, que receberam a mesma ração que o grupo H, apresentaram valores estatisticamente similares de CT em relação ao grupo controle, como se observa na Figura 6.10.

Figura 6.10. Concentração plasmática de colesterol total em hamsters.

Resultado semelhante foi evidenciado por BOBEK (1999), que comparou os efeitos de bagaço de tomate e uva sobre o perfil sérico de lipídios e antioxidantes em ratos. Após oito semanas de experimento, o autor detectou redução de 70% a 108% de colesterol total nos grupos que receberam 15% de bagaço em relação ao grupo controle, ao qual foi administrado celulose na mesma quantidade. Vale ressaltar que o bagaço de uva apresentou melhores resultados do que o bagaço de tomate.

Na fração HDL-colesterol (HDL-c), somente o grupo BS apresentou resultado similar ao grupo controle. Os valores dos demais grupos foram semelhantes ao do grupo H (Figura 6.11).

Figura 6.11. Concentração plasmática da fração HDL-c em hamsters.

A fração do colesterol não-HDL representa a soma de LDL-c e VLDL-c, como mencionado no item 5.5.6. Os resultados indicam que, na fração de colesterol não-HDL, o valor de todos os grupos tratados foi inferior ao do grupo H, embora a diferença tenha sido significativa apenas em relação aos grupos C ($p=0,005$) e BS ($p=0,001$) (Figura 6.12). Os valores desta diferença variaram de 50% (grupo EV) a 115% (grupo BS).

Figura 6.12. Concentração plasmática da fração não-HDL-c em hamsters.

Os resultados referentes às concentrações de triglicérides (TG) apresentaram diferenças ainda maiores entre os grupos. Todos os grupos tratados apresentaram valores similares ao grupo controle; em relação ao grupo H, os resultados médios foram de 138% (grupo BS) a 167% (grupo EV) inferiores. Este dado indica que a ração com gordura de coco e colesterol sem a suplementação elevou consideravelmente a concentração de TG no modelo animal adotado, sendo 133% superior ao grupo controle (Figura 6.13).

Figura 6.13. Concentração plasmática de triglicérides em hamsters.

A acentuada redução de triglicérides nos grupos tratados com extrato ou bagaço de uva pode ser decorrente da alta concentração de certos compostos fenólicos: as epicatequinas. Sementes de uvas são particularmente ricas nestes compostos, os quais são responsáveis pelo sabor e adstringência característicos em vinhos e sucos de uva (KALLITHRAKA *et al.*, 1995). ZERN *et al.* (2003) constataram a redução plasmática de triglicérides e VLDL-c em 39 e 50% respectivamente em porquinhos-da-índia, administrando farinha de uva liofilizada. DEL BAS *et al.* (2005) também demonstraram a redução significativa de triglicérides no plasma de ratos pela administração de procianidinas, polifenóis encontrados em uvas. CHAN *et al.* (1999) investigaram o efeito das epicatequinas no perfil lipídico de

hamsters, e concluíram que estas substâncias levaram à redução dos níveis plasmáticos de triglicérides em 35% e colesterol total em 31% em relação ao grupo controle (que corresponderia ao grupo H do presente estudo). As catequinas foram administradas na forma de extrato de chá de jasmim, na concentração de 5,7 g/kg de dieta, o que equivale a 76 mg/100 g peso do animal. Esta quantidade é consideravelmente superior ao teor de fenólicos fornecidos aos grupos EV e ES, que foi 10,4 mg/100 g peso. Apesar disso, a redução da trigliceridemia no presente estudo foi mais acentuada do que o observado no estudo citado (62,7% no grupo EV e 58,1% no grupo ES em relação ao grupo H).

O mecanismo de ação pelo qual as catequinas do chá e polifenóis da uva reduzem a colesterolemia foi investigado. Uma das possibilidades seria a inibição da síntese hepática da enzima HMG-CoA redutase. Sabe-se que esta enzima está implicada na conversão de acetato em ácido mevalônico na cadeia de reações químicas, que ocorrem para a síntese de colesterol. Com a redução da quantidade de colesterol formado no hepatócito, ocorre maior síntese de receptores de membrana que captam lipoproteínas ricas em colesterol, as quais se reduzem na circulação (BURSILL *et al.*, 2001; PAL *et al.*, 2003). Entretanto, CHAN *et al.* (1999) não encontraram correlação do efeito hipolipemiante das catequinas do chá com a inibição da síntese desta enzima. Assim, os mesmos especularam que o rearranjo do perfil lipídico pode ser resultante do efeito inibitório das catequinas sobre a absorção dos lipídios da dieta (incluindo o colesterol) e da reabsorção de ácidos biliares.

Comparando-se os valores entre os todos os grupos tratados, ou seja, entre EV, ES, BV e BS, verifica-se a ausência de diferenças significativas na maior parte dos resultados, podendo-se inferir com este fato algum efeito integrado do conjunto de

componentes remanescentes nos resíduos da uva sobre o perfil lipídico do hamster. Assim, os resultados foram similares entre os grupos, independentemente da forma como foi administrada (extrato ou farinha de bagaço). É importante ressaltar que o teor de compostos bioativos nos extratos e nas farinhas de bagaço difere qualitativa e quantitativamente, apesar da homogeneidade nos resultados. Os compostos de interesse são os polifenóis e as fibras; estas últimas predominam nas farinhas (FBV e FBS), adicionadas à ração hiperlipemiante a 20%, enquanto os compostos fenólicos estão em maior quantidade nos extratos. Quando uma variedade de substâncias bioativas é administrada em conjunto, pode ocorrer um efeito sinérgico entre os compostos, melhorando os parâmetros biológicos (SÁNCHEZ-MORENO, *et al.*, 1999). Ou seja, os grupos BV e BS, que receberam uma quantidade inferior de polifenóis (em relação à EV e ES), pode ter se beneficiado com as fibras presentes no bagaço. Corroborando esta hipótese, MARTÍN-CARRÓN *et al.*, (1999) e SAURA-CALIXTO (2006) acreditam que um dos mecanismos de ação das fibras presentes na uva seria pela adsorção de lipídios, favorecendo sua excreção e reduzindo sua concentração na corrente sanguínea.

Como mencionado anteriormente, foi descrita a presença de uma nova classe de fibras em bagaço de uva (SAURA-CALIXTO, 1998), denominadas de fibra alimentar antioxidante (FAA), que se constituem por polifenóis associados à fibras. O autor classificou estes compostos em polifenóis extraíveis (PE) e não extraíveis (PNE). Estudando os efeitos destes polifenóis em modelos experimentais com animais, MARTÍN-CARRÓN *et al.* (1997) demonstraram que a maior parte dos PE (flavonóides, procianidinas e ácidos fenólicos) é biodisponível, em contraste com os PNE (taninos condensados), que são quase totalmente excretados. É provável que a

melhora do perfil lipídico seja, em parte, devida à presença dos PNE no bagaço da uva, uma vez que estes favorecem a excreção de lipídios por mecanismos de adsorção. Em consequência, há uma melhora do perfil lipídico e da função intestinal (MARTÍN-CARRÓN *et al.*, 1997).

Quanto ao efeito antioxidante, este é atribuído à fração PE da fibra alimentar antioxidante. Esta fração, extraída de casca de uva, foi submetida ao teste de capacidade antioxidante pelo método do DPPH, juntamente com vinho tinto. Verificou-se que 4 mg de PE removeram o radical DPPH $\cdot$ na mesma proporção que 6,1 mg de compostos fenólicos extraídos do vinho (SAURA-CALIXTO, 1998). O PE foi isolado a partir de uma farinha de casca de uva, produto comercialmente disponível na Espanha (Vitis Fibre®, Madri), composta basicamente por FAA. Do total de fibras presentes neste produto, 1 a 9% são constituídos de PE, enquanto 15 a 30% representam a fração PNE. Com base nestes achados, pode-se dizer que as fibras do bagaço de uva associam duas propriedades benéficas: aquelas já conhecidas sobre a função fisiológica do intestino, conferindo volume fecal e prevenção de constipação intestinal, e as propriedades antioxidantes, mitigando os efeitos provocados por danos oxidativos.

Estudos anteriores com bagaço de uvas viníferas também demonstraram propriedades antioxidantes através de diferentes metodologias (LARRAURY *et al.*, 1996a; CHIDAMBARA MURTHY *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2002; NEGRO *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-PARAMÁS, 2004; GOÑI *et al.*, 2007; MONAGAS *et al.*, 2007).

Os mecanismos de ação pelos quais os antioxidantes modulam o perfil lipídico *in vivo* não estão totalmente elucidados. Entre as primeiras teorias está a proposta por GUTTERIDGE (1995), em que os antioxidantes atuam inibindo a

peroxidação lipídica. Esta teoria foi confirmada posteriormente por diversos outros autores, estando hoje bem estabelecida. Outros mecanismos propostos incluem:

- 1) Redução da produção hepática de apolipoproteína B (apo B), levando à inibição da absorção de colesterol e consequentemente interrupção na produção e secreção de quilomicrons, diminuindo os níveis de lipoproteínas circulantes no plasma (ZERN *et al.*, 2005a);
- 2) Alteração do metabolismo de lipoproteínas, levando à redução da concentração plasmática de triglicerídeos e apo B, evidenciado em hamsters (VINSON *et al.*, 2001; AUGER *et al.*, 2002), porquinhos-da-índia (ZERN *et al.*, 2003) e mulheres pré e pós-menopausadas (ZERN *et al.*, 2005b). Neste último estudo, os polifenóis da uva reduziram significativamente os níveis sanguíneos de triglicerídeos, apo B, apo E e LDL-colesterol;
- 3) Efeito anti-inflamatório por inibição da expressão do fator de transcrição NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), responsável pela ativação de citocinas, moléculas de adesão ao endotélio e proteínas pró-coagulantes, e desta forma reduzindo a formação de placas de ateroma (ESTRUCH *et al.*, 2004).

Os grupos que receberam a dieta suplementada com o bagaço (BV ou BS) provavelmente se beneficiaram com os efeitos das fibras (FAA), além dos polifenóis. Entretanto, como mencionado anteriormente, não houve diferença significativa nos resultados referentes ao perfil lipídico entre os grupos tratados, seja com extrato (sem FAA) ou com farinha de bagaço (com FAA). Considerando que a quantidade de polifenóis administrada nos grupos EV e ES foi equivalente ao oferecido para os grupos BV e BS, os efeitos biológicos nestes últimos grupos deveriam ser, em tese,

mais acentuados do que nos primeiros. Entretanto, a qualidade dos polifenóis foi, possivelmente, um fator decisivo. Ou seja, o efeito biológico dos extratos (EV e ES) pode ter sido tão eficiente quanto ao das dietas suplementadas (BV e BS) em função das diferenças qualitativas na composição de polifenóis entre os grupos. Sabe-se que os efeitos biológicos são diversos entre as diferentes classes de polifenóis, e dependem de fatores como: estrutura química, associação com outras moléculas, polaridade, etc (HAN *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2007).

De qualquer modo, os dados apresentados convergem para a hipótese de que os compostos bioativos presentes em uvas, particularmente uvas tintas, são efetivos na melhora do perfil lipídico em sistemas biológicos.

6.5.3 Inibição da oxidação de LDL-c

Foi testada a habilidade dos compostos bioativos dos resíduos da uva em proteger as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) sob condições oxidativas. A suscetibilidade das LDL-c à oxidação foi determinada pelo tempo de resistência destas lipoproteínas à oxidação (*lag time*) na presença de antioxidantes da uva.

Como mencionado no item 5.5.7, foi necessário obter um *pool* de plasma de 3 a 4 animais, dependendo do volume obtido por animal. Para compor 10 resultados para cada grupo seria necessário sacrificar 180 animais, o que provavelmente estaria fora dos padrões normativos do Comitê de Ética. Deste modo, obtiveram-se três resultados para cada grupo, ou seja: *lag time* 1, 2 e 3, que corresponde a uma análise por grupo, feita em triplicata. (Tabela 6.14).

Cada valor de *lag time* corresponde ao tempo em que as lipoproteínas resistiram à oxidação induzida no meio, ou seja, quanto maior o valor do *lag time*, maior a resistência da amostra à oxidação, sugerindo que os antioxidantes presentes conferiram proteção às amostras contra a oxidação.

Tabela 6.14. *Lag time* (min) de oxidação de LDL-c em *pool* de plasma de hamsters.

	C (min)	H (min)	EV (min)	ES (min)	BV (min)	BS (min)
<i>Lag time</i> 1	80	79	112	105	112	102
<i>Lag time</i> 2	81	92	97	110	102	99
<i>Lag time</i> 3	98	70	89	91	98	115
Média	86	80	99	102	104	105
DP	10,1	11,1	11,7	9,8	7,2	8,5

Cada amostra representa o *pool* de plasma de 3 a 4 hamsters, gerando 3 resultados por grupo. Min= minutos; DP=desvio padrão; C=controle; H=hipercolesterolêmico; EV=extrato do bagaço do vinho; ES =extrato do bagaço do suco; BV=bagaço do vinho 20%; BS=bagaço do suco 20%; DP=desvio padrão. Ref: ESTERBAUER *et al.*, 1989.

Em função do número restrito de resultados, não foi realizada análise de variância para comparação das médias. Os valores foram então comparados descritivamente. A menor média observada entre os grupos tratados foi do grupo EV (99 minutos), que foi de aproximadamente 15% superior ao grupo controle. A maior média foi apresentada pelo grupo BS (105 minutos), ou seja, 22% superior ao grupo controle.

Conforme se observa na Figura 6.14, todos os grupos tratados com antioxidantes apresentaram valores superiores em relação aos grupos controle e hipercolesterolêmico. Este dado sugere que os antioxidantes da uva conferem proteção oxidativa às lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c).

Figura 6.14. *Lag time* (min) de oxidação de LDL-c em *pool* de plasma de hamsters. Cada amostra representa o *pool* de plasma de 3 a 4 hamsters, gerando 3 resultados por grupo. 1= controle; 2=hipercolesterolêmico; 3=EV; 4=ES; 5=BV; 6=BS.

Outros estudos relataram que antioxidantes da uva foram eficazes na inibição da oxidação de LDL-c. FRANKEL *et al.* (1995) estão entre os pioneiros na divulgação da eficácia dos polifenóis da uva na inibição da oxidação de LDL-c isoladas de plasma humano. SHAFIEE *et al.* (2003) utilizaram sementes e cascas de uvas em pó, e as lipoproteínas foram isoladas de plasma humano, assim como os relatos de CARBONNEAU *et al.* (1997) e CARTRON *et al.* (2001). Em todos os estudos citados foram utilizados compostos fenólicos, que se mostraram eficazes neste ensaio. Entretanto, não foram encontrados estudos utilizando esta técnica em plasma de roedores.

Na comparação dos dados entre os grupos tratados, pode-se inferir que houve homogeneidade (Figura 6.15) aparente nos valores, indicando que a forma como os antioxidantes foram administrados (extrato ou farinha de uva) não influenciou no efeito sobre a oxidação de LDL-c.

Figura 6.15. Intervalo de confiança (95%) da inibição da oxidação de LDL-c em *pool* de plasma de hamsters.

C=controle; H=hipercolesterolêmico; EV=extrato do bagaço do vinho; ES=extrato do bagaço do suco; BV=bagaço do vinho 20%; BS=bagaço do suco 20%.

Um dos mecanismos de ação propostos consiste na capacidade do antioxidante em inibir a produção de radical superóxido. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é reconhecido como um dos principais responsáveis pela oxidação das LDL-c (STEINBRECHER, 1988). Deste modo, a inibição da produção desta espécie reativa pelo antioxidante levará à maior resistência das LDL-c à oxidação.

Em síntese, os resultados expostos sugerem que os compostos antioxidantes da uva tornaram a lipoproteína menos suscetível a processos oxidativos.

6.5.4 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Os resultados relativos à atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) estão apresentados na Tabela 6.15.

Tabela 6.15. Atividade das enzimas antioxidantes. Valores em média $\pm$ desvios padrão.

Grupos	GPx (U/g prot)	SOD (U/g prot)	CAT (U/g prot/min)
BS	1,12 $\pm$ 0,33 ^a	53,9 $\pm$ 20 ^a	1876 $\pm$ 430 ^a
BV	1,10 $\pm$ 0,20 ^{a,b}	44,6 $\pm$ 15 ^{a,b}	1834 $\pm$ 393 ^a
C	1,01 $\pm$ 0,37 ^{a,b}	54,5 $\pm$ 20 ^a	529 $\pm$ 158 ^b
ES	1,01 $\pm$ 0,14 ^{a,b}	60,0 $\pm$ 23 ^a	1839 $\pm$ 484 ^a
EV	0,85 $\pm$ 0,23 ^{a,b}	51,3 $\pm$ 27 ^{a,b}	1469 $\pm$ 382 ^a
H	0,80 $\pm$ 0,21 ^b	27,0 $\pm$ 128 ^b	410 $\pm$ 100 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). BS=bagaço do suco 20%; BV=bagaço do vinho 20%; C=controle; ES=extrato do bagaço do suco EV=extrato do bagaço do vinho H=hipercolesterolêmico.

Com relação à atividade da enzima GPx, observa-se que somente o grupo BS apresentou valor significativamente superior ao grupo H ($p < 0,05$).

Os valores dos demais grupos (BV, ES, EV e C) foram superiores em relação ao grupo H, mas a diferença não foi significativa ($<$ valor de $p = 0,13$, para o grupo BV). Apesar disso, verifica-se uma tendência no aumento da atividade de GPx nos grupos tratados com extrato ou bagaço de uva, principalmente em comparação ao grupo H. A Figura 6.16 apresenta os valores médios mediante intervalo de confiança relativos à atividade de GPx.

Figura 6.16. Intervalo de confiança da atividade de GPx.

BS=bagaço do suco 20%; BV=bagaço do vinho 20%; C=controle;
ES=extrato do bagaço do suco EV=extrato do bagaço do vinho
H=hipercolesterolêmico.

O grupo hipercolesterolêmico apresentou atividade enzimática significativamente inferior aos demais grupos, nas três enzimas avaliadas. Este dado reforça a hipótese de que dietas ricas em colesterol e pobre em antioxidantes contribuem para um elevado grau de lipoperoxidação, exacerbando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequentemente inibindo a atividade das enzimas antioxidantes (ALIA *et al.*, 2003). Como se verifica na figura 6.17, a média da atividade de SOD para o grupo H foi inferior a todos os demais grupos, sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos BS, C e ES. Os grupos

BV e EV não apresentaram diferença significativa em relação a H, apesar dos valores serem superiores.

Figura 6.17. Intervalo de confiança da atividade de SOD.

BS=bagaço do suco 20%; BV=bagaço do vinho 20%; C=controle;
ES=extrato do bagaço do suco EV=extrato do bagaço do vinho
H=hipercolesterolêmico.

Ao contrário do observado nas outras enzimas, a catalase (CAT) apresentou um nítido aumento em sua atividade para todos os grupos tratados com os componentes da uva, como se observa na Tabela 6.15 e Figura 6.18. Os resultados dos grupos C e H são significativamente inferiores em relação aos demais grupos. Na comparação entre os grupos C e H, a atividade da CAT foi inferior no grupo H, embora esta diferença não seja significativa.

Figura 6.18. Intervalo de confiança da atividade de CAT.

BS=bagaço do suco 20%; BV=bagaço do vinho 20%; C=controle;
 ES=extrato do bagaço do suco EV=extrato do bagaço do vinho
 H=hipercolesterolêmico.

Entre os grupos tratados com os componentes da uva (EV, ES, BV e BS) não foram detectadas grandes diferenças na atividade das três enzimas – com isso, pode-se inferir que, de um modo geral, a via de administração dos compostos bioativos da uva (extrato ou farinha) não interferiu de maneira significativa na atividade das enzimas avaliadas. Entretanto, é interessante notar que ES e BS apresentaram resultados superiores a EV e BV. Os valores de SOD foram significativamente superiores a H somente para ES e BS. Isto pode indicar uma possível influência do teor de antioxidantes fenólicos, que é superior tanto no extrato quanto no bagaço do suco, em relação ao bagaço do vinho.

Como citado anteriormente, não somente os polifenóis da uva exercem atividade antioxidante, mas também as fibras, como evidenciando por SAURACALIXTO (1998). Este dado foi constatado também por ALIA *et al.* (2003), que isolou as fibras da semente de uva e administrou em ratos, elevando desta forma a atividade das enzimas antioxidantes no fígado.

Outras pesquisas comprovaram aumento da atividade enzimática em modelo animal (roedores), utilizando compostos antioxidantes da uva (BOBEK, 1999; KASDALLAH-GRISSA *et al.*, 2003) ou de outros vegetais, como a polpa de tamarindo (MARTINELLO *et al.*, 2006).

No geral, nota-se pelos resultados, uma tendência de níveis maiores nos grupos tratados, particularmente no grupo BS (Figuras 6.16 a 6.18). Outro dado relevante foram os resultados inferiores do grupo H em relação aos demais grupos – embora esta inferioridade não tenha sido significativa na atividade de GPx e SOD, nas três enzimas os valores foram inferiores, particularmente com relação a atividade da catalase. Reforça-se, portanto, a hipótese de que a dieta aterogênica (grupo H) promove o estresse oxidativo; em contrapartida, polifenóis e fibras da uva podem contribuir para a melhora da defesa antioxidante endógena.

6.6 Desenvolvimento e caracterização de preparações com FBV e FBS

6.6.1 Desenvolvimento de picolé e *sorbet*

Como exposto nas Tabelas 6.18 e 6.19, foram adicionados 5% de farinha (FBV/FBS) às preparações. A apresentação final dos picolés e *sorbets* encontra-se nas Figuras 6.19 e 6.20, respectivamente.

Tabela 6.18. Formulação do picolé de FBV e FBS.

Ingredientes	Quantidade
Água potável	1842,8 mL (68,24%)
Açúcar cristal	405,0 g (15,00%)
Xarope de glicose de milho	297,0 g (11,00%)
Goma Xantana	1,4 g (0,11%)
FBV ou FBS	65,0 g (5,00%)
Ácido cítrico	3,1 g (0,24%)
Corante azul brilhante	0,05 g (0,04‰)
Corante vermelho <i>bordeaux</i>	0,1 g (0,01‰)

FBV= farinha de bagaço de uva do vinho; FBS=farinha de bagaço de uva do suco.

Figura 6.19. Picolé de bagaço do vinho (à esquerda) e picolé de bagaço do suco (à direita).

Tabela 6.19. Formulação do *sorbet* de FBV e FBS.

Ingredientes	Quantidade
Água potável	1842,8 mL (68.24%)
Açúcar cristal	405,0 g (15.00%)
Xarope de glicose de milho	297,0 g (11.00%)
Estabilizante para sorvete	13,5 g (0.50%)
FBV ou FBS	135,0 g (5.00%)
Corante azul brilhante	0,01 g (0,04‰)
Corante vermelho <i>bordeaux</i>	0,3 g (0,01‰)

FBV= farinha de bagaço de uva do vinho; FBS=farinha de bagaço de uva do suco.

Figura 6.20. *Sorbet* de bagaço do vinho (à esquerda) e *sorbet* de bagaço do suco (à direita).

6.6.2 Análise microbiológica

Os resultados da análise microbiológica indicaram que todas as amostras estavam próprias para consumo (Anexos 11 a 14).

6.6.3 Análise de cor

6.6.3.1 Picolés

Encontram-se na Tabela 6.20 os parâmetros de cor das matérias primas (farinhas) e das formulações (picolés). A diferença de cor entre as amostras está representada na Tabela 6.21.

Tabela 6.20. Parâmetros de cor das farinhas de BS e BV, dos picolés obtidos com estas farinhas e de picolé comercial, sabor uva.

Amostra	L*	a*	b*	Croma	Tom
Farinha de BS	29,94 ± 0,14	17,01 ± 0,03	6,61 ± 0,07	18,25 ± 0,01	21,23 ± 0,25
Farinha de BV	32,96 ^a ± 0,13	11,04 ± 0,03	5,75 ± 0,07	12,45 ± 0,06	27,50 ± 0,24
Picolé de BS	32,86 ^a ± 0,57	5,75 ± 0,14	-0,07 ± 0,02	5,75 ± 0,14	359,32 ± 0,20
Picolé de BV	18,86 ± 0,42	3,83 ± 0,16	0,37 ± 0,00	3,84 ± 0,16	5,51 ± 0,17
Picolé comercial	28,04 ± 0,55	12,67 ± 0,17	1,02 ± 0,12	12,71 ± 0,16	4,61 ± 0,55

Mesmas letras na coluna indicam não haver diferença significativa entre as amostras. L*=luminosidade; a*= oposição vermelho/verde (+a* para verde e -a* para vermelho); b*= oposição azul/ amarelo (+b* para o amarelo e -b* para o azul).

Tabela 6.21. Diferença de cor entre as amostras de picolés farinhas e picolé comercial.

Comparação	Δ L*	Δ a*	Δ b*	Δ E _{ab}
Picolé e farinha de BS	2,92	-11,26	-6,68	13,41
Picolé e farinha de BV	-14,10	-7,21	-5,38	16,73
Picolé BS e picolé BV	14,01	1,93	-0,44	14,14
Farinha de BS e de BV	-3,02	5,97	0,86	6,75
Picolé BS e picolé comercial	4,82	-6,91	-1,09	8,50
Picolé BV e picolé comercial	-9,19	-8,84	-0,65	12,76

Os resultados mostram haver diferença de cor entre as farinhas do bagaço de vinho e do suco de uva ($\Delta E_{ab}=6,75$). Observou-se que a diferença de cor entre os picolés ($\Delta E_{ab}=14,14$) foi maior do que a encontrada para as farinhas. Cabe salientar que as preparações contêm as mesmas concentrações de farinha de bagaço, ou seja, 5%. Os demais ingredientes que compõem a formulação dos picolés também são os mesmos, variando apenas na farinha (FBV ou FBS). A diferença na cor entre o produto acabado (picolé) e a farinha se justifica pela adição de corantes na formulação (Tabela 6.18).

Quanto à comparação entre a amostra comercial e os picolés de FBV e FBS, estes últimos apresentam diferenças nos parâmetros de cor em relação ao picolé comercial. Devem ser consideradas além das diferenças de matéria prima, as diferenças de composição da formulação e do processamento como fatores responsáveis pela diferença de cor entre estes produtos. Mesmo assim, as amostras apresentaram valores de ângulo de tom em uma região próxima no espaço de cor ($359 - 5^\circ$).

O picolé obtido com o bagaço de suco foi o que apresentou a menor diferença total de cor em relação à amostra comercial, o que pode ter influenciado na melhor aceitação desta amostra pelos degustadores, como discutido no item 6.6.4.

6.6.3.2 Sorbets

A Tabela 6.22 expõe os parâmetros de cor das matérias primas e das formulações. A diferença de cor entre as amostras de *sorbets* e farinhas está representada na Tabela 6.23.

Tabela 6.22. Parâmetros de cor das farinhas de BS e BV e dos *sorbets* obtidos com as farinhas.

Amostra	L*	a*	b*	Croma	Tom
Farinha de BS	29,94 ^a ± 0,14	17,01 ± 0,03	6,61 ± 0,07	18,25 ± 0,01	21,23 ± 0,25
Farinha de BV	32,96 ± 0,13	11,04 ± 0,03	5,75 ± 0,07	12,45 ± 0,06	27,50 ± 0,24
<i>Sorbet</i> de BS	30,73 ^a ± 0,37	19,91 ± 0,09	0,07 ± 0,00	19,91 ± 0,09	0,20 ± 0,00
<i>Sorbet</i> de BV	19,62 ± 1,08	9,41 ± 0,44	1,10 ± 0,07	9,48 ± 0,44	6,64 ± 0,37

Mesmas letras na coluna indicam não haver diferença significativa entre as amostras. L*=luminosidade; a*= oposição vermelho/verde (+a* para verde e -a* para vermelho); b*= oposição azul/ amarelo (+b* para o amarelo e -b* para o azul).

Tabela 6.23. Diferença de cor entre das amostras de *sorbets* e farinhas.

Comparação	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE_{ab}
<i>Sorbet</i> e farinha de BS	0,79	2,90	-6,54	7,20
<i>Sorbet</i> e farinha de BV	-13,33	-1,63	-4,65	14,21
<i>Sorbet</i> BS e <i>sorbet</i> BV	11,11	10,50	-1,03	15,32
Farinha de BS e de BV	-3,02	5,97	0,86	6,75

Os resultados indicam diferença de cor entre as farinhas do bagaço de vinho e do suco ($\Delta E_{ab}=6,75$). Observou-se que a diferença de cor entre os produtos ($\Delta E_{ab}=15,32$) é maior do que a encontrada para as matérias primas. A maior diferença foi encontrada entre a farinha (FBV) e *sorbet* de FBV, devido ao aumento de luminosidade. Não foi encontrado um produto comercial (*sorbet* de uva) para fazer a comparação nos parâmetros de cor com os *sorbets* desenvolvidos neste estudo.

6.6.4 Análise sensorial

Em ambos os dias de análise, aplicou-se o teste de aceitação pela escala hedônica estruturada de nove pontos, seguida do teste de preferência.

Dos 43 degustadores, 31 eram do sexo masculino (72,1%) e 12 do sexo feminino (27,9%). A faixa etária foi de $31,1 \pm 12,0$ anos, apresentando a seguinte proporção: 46,5% = 9 a 25 anos; 27,9% = 26 a 39 anos; 25,6% = 40 anos ou mais.

6.6.4.1 Picolés

As medidas de aceitação sensorial dos picolés estão apresentadas na Tabela 6.24, onde se constata que o picolé elaborado com BS apresentou aceitação de cor, textura, sabor e aceitação global significativamente maior ($p < 0,05$) do que o picolé de BV.

Tabela 6.24. Aceitação dos picolés com BV e BS segundo atributos sensoriais. Valores apresentados como média $\pm$ desvios-padrão.

Amostra	Cor	Textura	Sabor	Global
Picolé de BS	$7,81^a \pm 1,19$	$6,81^a \pm 1,47$	$6,96^a \pm 1,52$	$6,94^a \pm 1,31$
Picolé de BV	$5,98^b \pm 2,30$	$5,02^b \pm 2,27$	$5,51^b \pm 2,09$	$5,28^b \pm 2,03$

Média e desvio padrão de 43 degustadores. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

MUÑOZ *et. al.* (1992) consideram o valor 6 em uma escala hedônica estruturada de 9 pontos como um limite de qualidade e de comercialização para

alimentos. Utilizando este valor como limite de referência de aprovação, a porcentagem de valores hedônicos atribuídos à faixa de aprovação da cor, da textura, do sabor e da avaliação global para o picolé de BS foram 100%, 86,7%, 88,9% e 88,9%, respectivamente; para o picolé de BV os valores foram 73,3%, 48,9%, 64,4% e 48,9%, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 6.25. Estes resultados mostram o elevado potencial de mercado do picolé de BS.

A cor foi o quesito com maior aceitação para as duas amostras (BV e BS).

No entanto, a aceitação da cor do picolé de BS foi maior que a do picolé de BV. Este dado é confirmado pela análise de cor (item 6.6.3.1, Tabela 6.20), onde se detectou maior proximidade da cor do picolé de BS com o picolé convencional, disponível no mercado comercial, o que pode ter justificado este resultado.

Tabela 6.25. Distribuição percentual dos valores hedônicos atribuídos aos parâmetros de aceitação dos picolés com bagaço do vinho (BV) e bagaço do suco (BS).

ATRIBUTO	ESCALA HEDÔNICA								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COR									
Picolé de BV (%)	6,4	6,4	2,1	12,8	2,1	19,1	21,3	21,3	8,5
Picolé de BS (%)	0,0	2,1	0,0	0,0	2,1	2,1	17,0	55,3	21,3
TEXTURA									
Picolé de BV (%)	6,4	8,5	10,6	25,5	2,1	12,8	21,3	6,4	6,4
Picolé de BS (%)	0,0	0,0	2,1	8,5	6,4	17,0	29,8	27,7	8,5
SABOR									
Picolé de BV (%)	4,3	4,3	8,5	17,0	4,3	25,5	19,1	12,8	4,3
Picolé de BS (%)	0,0	0,0	4,3	2,1	8,5	14,9	21,3	42,6	6,4
GLOBAL									
Picolé de BV (%)	4,3	4,3	2,2	39,1	2,2	15,2	15,2	13,0	4,3
Picolé de BS (%)	0,0	0,0	2,2	2,2	10,9	15,2	30,4	32,6	6,5

Valores da escala hedônica: 1=desgostei muitíssimo; 2=desgostei muito; 3=desgostei regularmente; 4= desgostei ligeiramente; 5= indiferente; 6=gostei ligeiramente; 7=gostei regularmente; 8=gostei muito; 9=gostei muitíssimo (PERYAM e GIRARDOT, 1952).

A distribuição dos valores hedônicos (Tabela 6.25) e os comentários dos degustadores (sensação de arenosidade) mostram que a textura foi um fator sensorial limitante, observado somente nos produtos com BV. Isto provavelmente se deve ao alto teor de fibras insolúveis na farinha de BV, que é consideravelmente maior do que na farinha de BS, como indicado no item 6.1.2, Tabela 6.1.

Com relação ao teste de preferência entre os produtos, 34 dos 43 provadores preferiram o picolé de BS (79,0%) (Figura 6.22), mostrando que o picolé de BS foi preferido em relação ao picolé de BV ($p < 0,001$, pelo teste de probabilidade binomial).

Figura 6.21. Preferência pela matéria-prima utilizada no picolé (BV ou BS).

Os resultados indicam a viabilidade da utilização de farinha de BS para a produção de picolés, com elevado potencial de mercado.

6.6.4.1 Sorbets

Os dados apresentados na Tabelas 6.26 indicam que a aceitação do *sorbet* elaborado com BS foi significativamente maior que a do *sorbet* de BV, em todos os parâmetros sensoriais ($p < 0,05$).

Tabela 6.26. Parâmetros de aceitação dos *sorbet* de bagaço do suco (BS) e de bagaço do vinho (BV).

Amostra	Cor	Textura	Sabor	Global
<i>Sorbet</i> de BS	$7,49^a \pm 1,46$	$7,02^a \pm 2,04$	$7,18^a \pm 1,51$	$7,11^a \pm 1,72$
<i>Sorbet</i> de BV	$6,27^b \pm 1,86$	$6,07^b \pm 1,84$	$6,13^b \pm 1,94$	$6,04^b \pm 1,83$

Média e desvio padrão de 45 provadores. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Como ocorreu com os picolés, a cor também foi o quesito com maior aceitação para as duas amostras (BV e BS), e a aceitação da cor do *sorbet* de BS também foi maior que a do *sorbet* de BV. O atributo sabor foi o segundo mais aceito, seguido de avaliação global, e por último a textura. Esta sequência de aceitação dos atributos foi a mesma encontrada para os picolés. A menor aceitação da textura se deu na preparação com BV, pelo mesmo motivo do que ocorreu no teste com picolé de BV, ou seja, pela sensação de arenosidade. Apesar disso, verifica-se, pelo critério de MUÑOZ *et. al* (1992), que a porcentagem de valores hedônicos atribuídos para aprovação da cor, textura, sabor e avaliação global foram 91,1%, 80%, 91,1% e 88,9%, respectivamente, para o *sorbet* de BS e 71,1%, 64,4%, 66,7% e 66,7%, respectivamente, para o *sorbet* de BV (Tabela 6.27).

Estes resultados mostram que ambas as amostras apresentam potencial de mercado. Embora os valores atribuídos para o *sorbet* de BV tenham sido inferiores aos de BS, a maior proporção dos dados concentra-se acima do valor 6 na escala hedônica.

Tabela 6.27. Distribuição percentual dos valores hedônicos atribuídos aos parâmetros de aceitação dos *sorbets* com bagaço do vinho (BV) e bagaço do suco (BS).

ATRIBUTO	ESCALA HEDÔNICA								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
COR									
<i>Sorbet</i> de BV (%)	0,0	0,0	11,4	13,6	4,5	18,2	27,3	13,6	11,4
<i>Sorbet</i> de BS (%)	0,0	0,0	0,0	9,1	0,0	13,6	13,6	40,9	22,7
TEXTURA									
<i>Sorbet</i> de BV (%)	2,3	0,0	2,3	22,7	9,1	18,2	18,2	20,5	6,8
<i>Sorbet</i> de BS (%)	0,0	4,5	4,5	9,1	2,3	6,8	18,2	29,5	25,0
SABOR									
<i>Sorbet</i> de BV (%)	2,3	2,3	6,8	9,1	11,4	15,9	27,3	15,9	9,1
<i>Sorbet</i> de BS (%)	0,0	0,0	4,5	2,3	2,3	22,7	15,9	34,1	18,2
GLOBAL									
<i>Sorbet</i> de BV (%)	2,4	2,4	2,4	16,7	11,9	19,0	16,7	23,8	4,8
<i>Sorbet</i> de BS (%)	2,4	2,4	2,4	16,7	11,9	19,0	16,7	23,8	4,8

Valores da escala hedônica: 1=desgostei muitíssimo; 2=desgostei muito; 3=desgostei regularmente; 4= desgostei ligeiramente; 5= indiferente; 6=gostei ligeiramente; 7=gostei regularmente; 8=gostei muito; 9=gostei muitíssimo (PERYAM e GIRARDOT, 1952).

Quanto ao teste de preferência, os resultados foram semelhantes aos encontrados com os picolés, ou seja, 83,7% preferiram o *sorbet* com BS (Figura 6.23), indicando que o *sorbet* de BS foi preferido em relação ao *sorbet* de BV ($p < 0,001$, pelo teste de probabilidade binomial).

Figura 6.22. Preferência pela matéria-prima da preparação (BV ou BS).

Em síntese, os resultados apresentados indicam que o picolé de BS e os *sorbets* de BV e BS foram aceitos sensorialmente. É possível que a baixa aceitação do picolé de BV esteja relacionada à existência de um similar comercialmente disponível no mercado, ou seja, o picolé convencional; embora o picolé comercial não tenha sido incluído na análise, provavelmente serviu como parâmetro de comparação com os picolés desenvolvidos.

Os atributos que mais influenciaram nesta análise foram a cor e a textura dos produtos. Como já discutido nos itens anteriores, o perfil de polifenóis difere entre as farinhas, o que pode refletir na cor de seus produtos derivados. Além disso, o teor de fibras também difere entre as farinhas. Os resultados observados indicam que o maior conteúdo de fibras insolúveis em FBV contribuiu de forma negativa na avaliação da textura das preparações testadas.

Desta forma, ficou evidenciado que as diferenças na composição entre as matérias-primas deste estudo influenciaram a aceitação sensorial dos produtos desenvolvidos.

Para melhor explorar as características sensoriais das matérias-primas, novas preparações devem ser desenvolvidas e avaliadas, incluindo receitas que melhorem a textura dos produtos com a farinha de BV.

Após a análise sensorial, foi solicitado o pedido de patenteamento do processo de obtenção de ambas as farinhas (FBV e FBS), sendo aprovado pela diretoria da Faculdade de Saúde Pública da USP em 05 de março de 2007. O protocolo foi então encaminhado à Agência USP de inovação e o processo, atualmente em andamento, foi protocolado sob o nº 07.1.266.6.8 (Anexo 15).

Foram submetidos para publicação dois artigos referentes à avaliação sensorial dos produtos com FBV e FBS (Anexos 16 e 17).

7. CONCLUSÕES

- ⇒ O modelo experimental, utilizando hamsters, foi adequado para avaliar o efeito *in vivo* dos subprodutos da uva sobre o perfil lipídico e atividade enzimática no tecido hepático, mas não parece ser indicado para avaliar a capacidade de inibir a oxidação de LDL-c, pois não permite análise estatística dos resultados.
- ⇒ Os subprodutos de ambas as espécies de uva foram eficazes na redução de lipídios no plasma de hamsters, principalmente com relação a triglicérides e colesterol total.
- ⇒ Houve melhora na capacidade antioxidante com a administração dos compostos bioativos das uvas nos dois parâmetros aplicados: inibição da oxidação de LDL-c e aumento da atividade das enzimas antioxidantes, principalmente da catalase.
- ⇒ Aparentemente a via de administração dos compostos da uva (extrato ou farinha de bagaço) não foi decisiva sobre os resultados biológicos observados, sugerindo que houve um efeito sinérgico entre os polifenóis e as fibras do bagaço de uva.
- ⇒ Como ingrediente funcional, a farinha de bagaço do suco (FBS) apresentou, em todos os parâmetros avaliados, um melhor perfil em comparação à farinha de bagaço do vinho (FBV), embora as diferenças não tenham sido significativas na maioria dos parâmetros avaliados.
- ⇒ Ambas as matérias primas (FBV e FBS) possuem atributos sensoriais aceitáveis, sendo estes atributos superiores em FBS.

- ⇒ Todos os resultados deste estudo permitem concluir que FBV e FBS possuem características promissoras como ingredientes funcionais, tanto no aspecto biológico quanto sensorial.

8. REFERÊNCIAS

Abe LT, da Mota RV, Lajolo FM, Genovese, MI. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc Tecnol Aliment** 2007; 27(2): 394-400.

Abell LL, Levy B B, Brodie BB, Kendall FE. 1958. Cholesterol in serum. **Standard Methods of Clinical Chemistry** (v.2), New York: Academic Press, 1958.p.26.

Aebi H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol** 1984;105:121-126.

Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, Yoshioka Y, Shoji T, Kanda T, Yamada K, Totsuka M, Teshima R, Sawada J, Goda Y, Maitani T. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. **FEBS Lett** 2005; 579: 4485-4491.

Albert AZ, Federico E. **Curso básico de iniciação ao vinho e à degustação** [curso *on line*]. Winexperts, 2002. Disponível em: <<http://www.winexperts.terra.com.br/htm>> [2007 jun 19].

Alexaki A, Wilson TA, Atallah MT, Handelman G, Nicolosi RJ. Hamsters fed diets high in saturated fat have increased cholesterol accumulation and cytokine production in the aortic arch compared with cholesterol-fed hamsters with moderately elevated plasma non-HDL cholesterol concentrations. **J Nutr** 2004;134: 410-415.

Alía M, Horcajo C, Bravo L, Goya L. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. **Nutr Res** 2003; 23:1251-1267.

Alonso AM, Guillén DA, Barroso CG, Puertas B, García A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content.. **J Agric Food Chem** 2002; 50(21):5832-6.

Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jiménez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. **Nutrition** 2006; 22:913-921.

Arakawa N, Otsuka M, Kurata T, Inagaki C. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid by high-performance liquid chromatography. **J Nutr Sci Vitam** 1981; 27:1-7.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official methods of analysis**. 15th ed. Washington, DC, 1990.

Auger C, Caporiccio B, Landraut N, Teissdre PL, Laurent C, Cros G, Rounanet J. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **J Nutr** 2002;132:1207-1213.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses **Food Chem** 2006; 99(1):191-203.

Barzilai A, Yamamoto KI. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair** 2004; (8-9):1109-15.

Bastianetto S, Brouillette J, Quirion R. Neuroprotective effects of natural products: interaction with intracellular kinases, amyloid peptides and a possible role for transthyretin. **Neurochem Res** 2007; 32(10):1720-1725.

Bastos DHM, Torres EAFS. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire: rev Soc Bras Alim Nutr** 2003; 26: 77-89.

Baydar NG, Özkan G, Yaşar S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts **Food Control** 2007; 18:1131-1136.

Bertelli AA, Gozzini A, Stradi R, Stella S, Bertelli A. Stability of resveratrol over time and in the various stages of grape transformation. **Drugs Exp Clin Res** 1998;24(4):207-11.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol** 1959; 37(8):911-917.

Bonilla F, Mayen M, Mérida J, Medina M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **F Chem** 1999;66:209-215.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976;72:248-254.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Delegacia Federal da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul. **Cadastro vitícola do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS: SDR-DENACOOPE/EMBRAPA-CNPUV/EMATER-RS/FECOVINHO, 1996. 43p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 210p.

Brasil. RDC nº 12, de 02/01/01. Aprova Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

Brenna OV, Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **J Agric Food Chem** 2001; 49: 4841-4844.

Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia de alta eficiência. **Rev Inst Adolfo Lutz** 2001; 60(1):53-57.

Bravo L, Saura-Calixto F. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. **Am J Enol Vitic** 1998; 49(2):135-141.

Brenna OV, Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **J Agric Food Chem** 2001; 49: 4841-4844.

Brown MS, Goldstein, JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science** 1986; 232:34-47.

Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB *et al.* Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **J Agric Food Chem** 2000; 48(2):220-230.

Bursill C, Roach PD, Bottema CD, Pal S. Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells. **J Agric Food Chem** 2001; 49(11):5639-5645.

Bussab WO, Morettin PA. **Estatística Básica**. 5ed. São Paulo: Saraiva, 2006.

Butterfield DA, Castegna A, Pocernich CB, Drake J, Scapagninib G, Calabrese V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem** 2002; (13): 444-461.

Camacho-Barquero L, Villegas I, Sanchez-Calvo JM, Talero E, Sanchez-Fidalgo S, Motilva V, de la Lastra AC. Curcumin, a curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **Int Immunopharmacol** 2007; 7: 333-342.

Cantos E, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **J Agric Food Chem** 2002; 50(20):5691-5696.

Cao X, Ito Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. **J Chromat A** 2003; 1021: 117-124.

Carbonneau MA, Léger CL, Monnier L, Bonnet C, Michel F, Fouret G, Dedieu F, Descomps B. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. **Eur J Clin Nutr** 1997; 51(10):682-690.

- Careri M, Corradini C, Elviri L, Nicoletti I, Zagnoni I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. **J Agric Food Chem** 2003; 51(18):5226-5231.
- Cartron E, Carbonneau MA, Fouret G, Descomps B, Léger CL. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. **J Nat Prod** 2001; 64(4):480-486.
- Chan PT, Fong WP, Cheung YL, Huang Y, Ho WKK, Chen ZY. Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet. **J Nutr** 1999; 129:1094-1101.
- Chatfield C, Adams G. Proximate Composition of American Food Materials. Washington: US Department of Agriculture, 1940.
- Chidambaram Murthy KN, Singh RP, Jayaprakasha GK. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. **J Agric Food Chem** 2002;50(21):5909-5914.
- Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids** 1987; 22:299-304.
- Csallany AS, Kindom SE, Addis PB, Lee JH. HPLC method for quantification of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids** 1989; 24: 645-651.
- Ctenas MLB. Ctenas AC, Quast D. **Frutas das Terras Brasileiras**. São Paulo: C2 Editora e Consultoria em Nutrição Ltda, 2000.
- Cui J, Tosaki A, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Maulik N, Das DK. Cardioprotective abilities of white wine. **Ann N Y Acad Sci** 2002;957:308-16.
- Das S, Das DK. Anti-inflammatory responses of resveratrol. **Inflamm Allergy Drug Targets** 2007; 6(3):168-73.
- Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life** 2001; 50:279 – 289.
- Del Bas JM, Fernández-Larrea J, Blay M, Ardèvol A, Salvadó MJ, Arola L, Bladé C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. **FASEB J** 2005;19(3):479-481.
- Du Y, Guo H, Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. **J Agric Food Chem** 2007;55:1695-1701.

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. **Free Radic Res Commun** 1989; **6**(1):67–75.

Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Rotilio D, de Gaetno G, Rubin E, Urbano-Marquez A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: A prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. **Atherosclerosis** 2004; **175**:117-123.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. **Mutat Res** 2004; **567**:1.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Statistical Databases**. Disponível em URL: <http://faostat.fao.org> [2007 06 jun].

Ferrari CKB, Torres EAFS. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomed Pharmacother** 2003; **57**:251–260.

Ferrari CKB. Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. **Maturitas** 2007; **58**:327-339.

Ferreira VLP. **Princípios e aplicações da colorimetria em alimentos**. Campinas: ITAL, 1981.

Fernandez ML, Wilson TA, Conde K, Vergara-Jimenez M, Nicolosi RJ. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. **J Nutr** 1999; **129**: 1323-1332.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol** 1984; **105**: 114-121.

França HH. O paradoxo da doença coronariana. **Arq Bras Cardiol** 2002; **79** (4): 419-21.

Francis FJ. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World** 2000; **45**:208-213.

Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **J Agric Food Chem** 1995; **43**:890-894.

Frei B. Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease. **J Nutr** 2004; **134**: 3196S-3198S.

Frémont L. Biological effects of resveratrol. **Life Sci** 2000; **66**:663-673.

Friedewald WT, Fredrick DS, Levy RI. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge **Clin Chem** 1972; 18 (6): 499-504.

Fruta KMG. **Efeito do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e da proteína isolada no metabolismo lipídico em hamsters hipercolesterolemizados.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado – FCF/FEA/FSP/USP].

Gabetta B, Fuzzati N, Griffini A, Lolla E, Pace R, Ruffilli T, Peterlongo F. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. **Fitoterapia** 2000; 71(2):162-75.

Gavino VC, Gavino G, Leblanc MJ, Tuchweber B. An Isomeric Mixture of Conjugated Linoleic Acids But Not Pure cis-9,trans-11-Octadecadienoic Acid Affects Body Weight Gain and Plasma Lipids in Hamsters **J Nutr** 2000;130:27-29.

Genovese MI, Santos RJ, Hassimotto, NMA, Lajolo, FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutos. **Rev Bras Cienc Farm** 2003; 39 (supl 3):167-169.

Göktürk Baydar N Akkurt M. Oil content and oil quality properties of some grape seeds. **Turkish J Agric Forestry** 2001; (25): 163-168.

Göktürk Baydar N, Özkan, G, Çetin ES. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. **Grasas y aceites** 2007; 58: 29-33.

Goñi I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebolé A, Arijia I, Estevez R. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. **Poult Sci** 2007;86(3):508-516.

González-Paramás AM, Esteban-Ruano S, Santos-Buelga C, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. **J Agric Food Chem** 2004;52(2):234-238.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem** 1995; 41(12):1819-1828.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 1990;186:1-85.

Halliwell B, Aeschbacht R, Loligert J, Aruoma OI. The characterization of Antioxidants. **Food Chem Toxic** 1995; 33 (7): 601-617.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford University Press: Oxford, 1999.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans** 2007;35(5):1147-1150.

Hamama AA, Nawar W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. **J Agric Food Chem** 1991; 39: 1063-1069.

Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. **Int J Mol Sci** 2007;8:950-988.

Hartman RE, Shah A, Fagan AM, Schwetye KE, Parsadanian M, Schulman RN, Finn MB, Holtzman DM. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis** 2006; 24:506-515.

Höner K, Cervellati R, Neddens C. Measurement of the *in vitro* antioxidant activity of German white wines using a novel method. **Eur Food Res Technol** 2002; 214:356-360.

Hsu CL, Yen GC. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Mol Nutr Food Res** 2008; 52 (1):53-61.

Ishimoto EY. **Atividade antioxidante *in vitro* em vinhos e sucos de uva**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública/USP].

Ishimoto EY, Ferrari CKB, Torres, EAFS. Vinho: aspectos culturais, composição química e benefícios cardiovasculares. **Nutrire - Rev Soc Bras Aliment Nutr** 2006; 31(3):127-141.

Izzo R., Muratore G. Seed lipids from some varieties of grapes grown in Sicily. I. Fatty acid composition. **Riv Ital Sostan Grass** 1993; 70(12):601-604.

Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J Physiol Pharmacol** 2004; 55: 503-517.

Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chem** 2001; 73:285-290.

Johnson H. **A História do Vinho**. São Paulo:Companhia das Letras, 1999.

Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. **FEBS Lett** 2005; 579:1653-1657.

Joris I, Zand T, Nunnari JJ, Krolikowski FJ, MAJNO G. Studies on pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. **Am J Pathol** 1983; 113: 341-358.

Ju ZY, Howard LR.. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **J Agric Food Chem** 2003; 51(18):5207-5213.

- Kahl R, Hildebrandt AG. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food Chem Toxicol**, 1986; 24: 1007-1014.
- Kallithraka S, Garcia-Viguera C, Bridle P, Bakker J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. **Phytochem Anal** 1995; 6: 265-267.
- Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **J Agric Food Chem** 2004; 52(14):4360-4367.
- Karakaya S, El SN, Tas AA. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **Int J Food Sci Nutr** 2001;52:501-508.
- Kawashima A, Madarame T, Koike H, Komatsu Y, Wise JA. Four week supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased protective serum antioxidants and folate and decreased plasma homocysteine in Japanese subjects. **Asia Pac J Clin Nutr** 2007;16(3):411-421.
- Khan MA, Nabi SG, Prakash S, Zaman A. Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida*. **Phytochemistry** 1986; 25: 1945-1948.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. **Antiox Redox Signal** 2008; 10(3):475-510.
- Kiviniemi TO, Saraste A, Toikka JO, Saraste M, Raitakari OT *et al.* A moderate dose of red wine, but not de-alcoholized red wine increases coronary flow reserve. **Atherosclerosis** 2007;195(2):176-181.
- Knight JA. The biochemistry of aging. **Adv Clin Chem** 2000;35:1-62.
- Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Ariga T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **J Agric Food Chem** 1999;47:1892-1897.
- Kowala MC, Grove RI, Aberg G. Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. **Atherosclerosis** 1994; 108(1):61-72.
- Kris-Etherton PM, Lefevre M, Beecher GR, Gross MD, Keen CL, Etherton TD. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. **Ann Rev Nutr** 2004; 24:511-538.
- Kunnumakkara AB, Guha S, Krishnan S, Diagaradjane P, Gelovani J, Aggarwal BB. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of

pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. **Cancer Res** 2007; 67:3853-3861.

Kuskoski EM, Asuero AG, Garcia A, Morales MT *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Cienc Rural** 2006; 36 (4):1283-1287.

Larrauri JA, Goñi I, Rupérez P, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of wine pomace. **Am J Enol Vitic** 1996a; 47:369-372.

Larrauri JA, Goñi I, Martín-Carrón N, Rupérez P, Saura-Calixto F. Measurement of health-promoting properties in fruit dietary fibres: antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. **J Sci Food Agric** 1996b; 71:515-519.

Larrauri JA, Rupérez P, Saura-Calixto F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **J Agric Food Chem** 1997; 45: 1390-1393.

Lissi EA, Cárceres T, Videla LA. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. **Free Radical Biol Med** 1986; 2:63-69.

Llobera A, Cañellas J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chem** 2007;101:658-666.

Louli V, Ragoussis N, Magoulas K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Biores Technol** 2004; 92: 201- 208.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951; 193:265-75.

Lucas EA, Khalil DA, Daggy BP. Arjmandi, B.H. Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. **J Nutr** 2001; 131:211-214.

Ma Y, Li W, Olendzki BC, Pagoto SL, Merriam PA, Chiriboga DE, Griffith JA, Bodenlos J, Wang Y, Ockene IS. Dietary quality 1 year after diagnosis of coronary heart disease. **J Am Diet Assoc** 2008;108(2):240-6.

Macfie HJ, Bratchell N, Greehof K. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order and carry-over effects in hall tests. **J Sens Studies** 1989; 4:129-148.

Machlin LJ, Bendich, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J**, 1987;1:441-445.

Marmer WN, Maxwell RJ. Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. **Lipids** 1981;16:365-371.

Martinello F. **Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese coloretal em hamster.** Riberão Preto; 2006. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP].

Martín-Carrón N, García-Alonso A, Goñi I, Saura-Calixto F. Nutritional and physiological properties of grape pomace as a potential food ingredient. **Am J Enol Vitic** 1997;48:328-332.

Martín-Carrón N, Goñi I, Larrauri JA, García-Alonso A, Saura-Calixto F. Reduction in serum total and LDL cholesterol concentrations by a dietary fiber and polyphenol-rich grape product in hypercholesterolemic rats. **Nut Res** 1999; 19:1371-1381.

Maxcheix JJ, Fleuriet A, Billot J. The main phenolics of fruits. In: **Fruit Phenolics**: CRC Press:Boca Raton, FL, 1990; p.1-98.

Mazza G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Crit Rev Food Sci Nutr** 1995; 35(4):341-371.

McMurtrey, K.D., Minn, J., Pobanz, K., and Shultz, T.P. (1994). Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. **J Agric Food Chem** 42: 2077-2080.

Mendonça S. **Efeito Hipocolesterolemizante da Proteína de Amarantho (*Amaranthus cruentus* BRS-Alegria) em Hamsters.** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública/USP].

Metcalf LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Anal Chem** 1966; 12: 514.

Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med** 1994;17(3):235-248.

Miller GL, Miller NE. Plasma high-density lipoprotein concentration and the development of ischaemic heart disease. **Lancet** 1975; 1: 16-9.

Monagas M, Hernández-Ledesma B, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. **J Agric Food Chem** 2006;54(2):319-327.

Morel DM, Di Corletto PE, Chisholm GW - Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. **Arteriosclerosis** 1984; 4: 357-364.

Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Susan K. Fried SH, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. **Nutrition** 2003; 19: 876- 879.

Mukai FH, Goldstein DB. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. **Science** 1976; 191:868.

Muñoz AM, Civille VG, Carr BT. **Sensory evaluation in quality control**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240 p.

Muñoz-Espada AC, Wood KV, Bordelon B, Watkins BA. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of concord, norton, and marechal foch grapes and wines **J Agric Food Chem** 2004; 52(22):6779 -6786.

Murthy CKN, Singh RP, Jayaprakasha GK. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. **J Agric Food Chem** 2002;50:5909-5914.

National Research Council (NRC). Nutrient requirements of hamsters In: **Nutrient Requirements of Laboratory Animals**. 1995; 4° ed. Washington, DC: National Academy Press; p.125-139.

Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresour Technol** 2003;87(1):41-44.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4ed. Boston: Irwin, 1996.

Neyestani TR, Shariatzadeh N, Gharavi A, Kalayi A, Khalaji N. Physiological dose of lycopene suppressed oxidative stress and enhanced serum levels of immunoglobulin M in patients with Type 2 diabetes mellitus: a possible role in the prevention of long-term complications. **J Endocrinol Invest** 2007; 30(10):833-838.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med** 1967;70(1):158-169.

Pakhale SS, Karibasappa GS, Ramchandani AG, Bhushan B, Sharma A. Scavenging effect of Indian grape polyphenols on 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical by electron spin resonance spectrometry. **Indian J Exp Biol** 2007;45:968-973.

Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. **J Nutr** 2003; 133: 700-706.

Paris A. **Breve história da uva e do vinho no Rio Grande do Sul**. [Economia Local, Setor Vinícola-História da uva e do vinho] Disponível em: <http://www.bentogoncalves.rs.gov.br/> [2008 jan 19].

Pearson AM, Gray IJ, Wolzak AM, Horenstein NA. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technol** 1983; 37:121.

Peryam DR, Girardot NF. Advanced taste test method. **Food engineering** 1952; 24: 58-61.

Prata PR. A Transição Epidemiológica no Brasil. **Cad Saúde Publ** 1992; 8(2):168-175.

Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory Study. **J Assoc Off Anal Chem** 1988; 71:1017-1023.

Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin Interv Aging** 2007;2(2):219-36.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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-76A rodent diet. **J Nutr** 1993; 123: 1939-1951.

Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and french paradox for coronary heart disease. **Lancet** 1992; 339: 1523-1526.

Rizzon LA, Miele A. Correção do mosto da uva Isabel com diferentes produtos na Serra Gaúcha. **Cienc Rural** 2005; 35:450-454.

Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. **Biochem Biophys Res Commun** 2008; 367(2):406-12.

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. (First of Two Parts). **New Engl J Med** 1976; 295: 369-77.

Rucinska A, Kirko S, Gabryelak T. Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells in vitro. **Cell Biol Int** 2007; 31 (11): 1371-1378.

Rudel LL, Kesainiemi A. Low-density lipoprotein particle composition: what is the contribution to atherogenicity? **Curr Opin Lipidol** 2000; 11: 227-8.

Sagara Y, Dargush R, Chambers D, Davis J, Schubert D, Aher P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic Biol Med** 1998; 24:1375-1389.

Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Res Int** 1999; 32:407-412.

Saura-Calixto F, Goñi I, Manas E, Abia R. Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fibre constituents: determination in grape pomaces. **Food Chem** 1991; 39: 299-309.

Saura-Calixto F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. **J Agric Food Chem** 1998;46:4303-4306.

Saura-Calixto F. Evolución del concepto de fibra. In: Lajolo FM, Menezes EW, orgs. **Carbohidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2006. p.237-253.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols : antioxidants and beyond. **Am J Clin Nutr** 2005;81(suppl):215S–7S.

Schieber DF Stintzing C, Carle R. Byproducts of plant food rocessing as a source of functional compounds – recent developments. **Trends Food Sci Technol** 2001; 12:401 -413.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **J Nutr Biochem** 2007; 18: 567-579.

Selwyn AP. Antiatherosclerotic effects of statins: LDL versus non-LDL effects **Curr Atheroscler Rep** 2007 Oct; 9(4):281-5.

Shafiee M, Carbonneau MA, Urban N, Descomps B, Leger CL. Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds. **Free Radic Res** 2003; 37(5):573-84.

Shahidi F, Alasalvar C, Liyana-Pathirana CM. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. **J Agric Food Chem** 2007; 55(4):1212-1220.

Shamberger RJ, Andreone TL, Willis CE. Antioxidants and cancer. IV. Malonaldehyde has imitating as a carcinogenic. **J Nat Cancer Inst** 1974; 53:1771.

Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Front Biosci** 2007;12:4839-54.

Shanmuganayagam D, Beahm MR, Osman HE, Krueger CG, Reed JD, Folts JD. Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and Humans. **J Nutr** 2002; 132:3592-3598.

Shrikhande AJ. Wine by-products with health benefits. **Food Res Int** 2000;33:469-474.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experim Physiol** 1997; 82:291-295.

Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **J Nutr** 2005; 135:969-972.

Silva BPF, Melo-Júnior MR, Araujo-Filho JLS, Patus VJRM, Cavalanti CBL, Pontes-Filho NT. Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos. **Rev Para Med** 2006; 20(1):7-14.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol** 1999; 299:152-178.

Simonetti P, Pietta P, Testolin G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. **J Agric Food Chem** 1997;45:1152-1155.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat Res** 2003; 531 (1-2): 231-251.

Smith SC, Jackson R, Pearson TA, Fuster V, Yusuf S, Faergeman O, *et al.* Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention: a scientific statement from the world heart and stroke forum. **Circulation** 2004; 109: 3112-21.

Solfrizzi V, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Santamato A, Ranieri M, Fiore P, Capurso A, Panza F. Lifestyle-related factors in predementia and dementia syndromes. **Expert Rev Neurother** 2008; 8(1):133-58.

Sosulski FW, Imafidon GI. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factor for animal and plant foods. **J Agric Food Chem** 1990; 38: 1351-1356.

Spanos GA, Wrolstad RE. Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. **J Agric Food Chem** 1990; 38:1565-1571.

Spiteller G. The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. **Mol Biotechnol** 2007;37(1):5-12.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC *et al.* IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol** 2007; 88(S1): 2-18.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med** 1989; 320:915-24.

Steinberg D, Witztum JL - Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. **J Am Med Ass** 1990; 264: 3047-52.

Steinbrecher UP. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. **Biochim Biophys Acta** 1988; 959(1):20-30.

Stocks J, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dormandy TL. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clin Sci Mol Med** 1974;47: 215-222.

Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **J Biol Chem** 1998; 273: 21875-21882.

Suckling KE, Benson GM, Bond B, Gee A, Glen A, Haynes C, Jackson B. Cholesterol lowering and bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment. **Atherosclerosis** 1991; 89:183-190.

Sutra T, Décorde K, Riss J, Dallas C, Cristol JP, Rouanet JM. A commercial extract of fruits and vegetables, Oxxynea, acts as a powerful antiatherosclerotic supplement in an animal model by reducing cholesterolemia, oxidative stress, and NADPH oxidase expression. **J Agric Food Chem** 2007;55(10):4258-63.

Terpstra AHM, Holmes JC, Nicolosi RJ. The hypercholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. **J Nutr** 1991; 121:944-947.

Thomas JA. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. In: Shils ME, Olson JA, ROOS AC. **Tratado de Nutrição Moderna a Saúde e na Doença**. 9 ed. São Paulo:Manole, 2003; cap 46, p801-811.

Tilotson JL, Grandits GA, Bartsch GE. Relation of dietary fibre to blood lipids in the special intervention and usual groups in the multiple risk factor intervention trial. **Am J Clin Nutr** 1997;65(suppl):3275-3276.

Toft U, Kristoffersen LH, Lau C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T. The Dietary Quality Score: validation and association with cardiovascular risk factors: the Inter99 study. **Eur J Clin Nutr** 2007; 61(2):270-8.

Torres EAFS, Rimoli CD, Olivo R, Hatano MK, Shimokomaki M. Papel do sal iodado na oxidação lipídica em hambúrgueres bovino e suíno (misto) ou de frango. **Ciênc Tecnol Aliment** 1998;18(1):49-52.

Torres JL, Varela B, García MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. **J Agric Food Chem** 2002;50(26):7548-7555.

Valiente C, Arrigoni E, Esteban RM, Amado R. Grape pomace as a potential food fiber. **J Food Sci** 1995; 60(4), 818-820.

Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis** 2001;156:67-72.

Vogels N, Nijs IMT, Westerterp-Plantenga MS. The effect of grape-seed extract on 24 h energy intake in humans. **Eur J Clin Nutr** 2004; 58: 667–673.

Xu M, Deng B, Chow YL, Zhao ZZ, Hu B. Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: a comparison with hydrocortisone. **J Ethnopharmacol** 2007; 112:292-299.

Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosc Biotech Biochem** 1998; 62: 1201-04.

Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **J Food Comp Anal** 2006;19:41-48.

Waterhouse AL. Wine and heart disease. **Chem Ind** 1995; 9 :338-341.

Wollin SD, Wang Y, Kubow S, JONES P JH. Effects of a medium chain triglyceride oil mixture and lipoic acid diet on body composition, antioxidant status, and plasma lipid levels in the Golden Syrian hamster. **J Nutr Biochem** 2004; 15: 402-410.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**. Washington DC: AICR, 2007.

World Health Organization. WHO sites. News. All news releases. 2004. **Who publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic**. Disponível em:<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr68/en/index/.html>. Acesso em 10/jan/2008.

Zern TL, West KL, Fernandez ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. **J Nutr** 2003; 133: 2268-2272.

Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. **J Nutr** 2005a; 135: 2291-2294.

Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. **J Nutr** 2005b; 135:1911-1917.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone:(55-11)3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 06 de setembro de 2007.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Elizabeth A. F. S. Torres

Faculdade de Saúde Pública da U.S.P.

Prezada Senhora:

Em reunião realizada na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT) analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto classificado sob no. 04/07 e intitulado **“Efeito antioxidante de subprodutos da vinificação e da produção de suco de uva”**, encaminhado pela pós-graduanda **Emília Yasuko Ishimoto**, sob orientação de Vossa Senhoria.

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi

Coordenador do CEP-IMT

**ANEXO 2 - PROTOCOLO nº 348 – COMISSÃO de ENSINO
e PESQUISA – HC/FMUSP**

INSTITUTO CENTRAL
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Av. DR. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR, 255
CEP 05403-900 SÃO PAULO - BRASIL

São Paulo, 24 de janeiro de 2006

Ilma. Sra.

Profª Dra. Elizabeth Ap. Ferraz S. Torres e Dra. Emília Yasuko Ishimoto

Depto. De Nutrição – Faculdade de Saúde pública / USP

Referência: Projeto de Pesquisa: **LACE**

**PR 348 “Efeito Antioxidante de subprodutos da
vinificação e da produção de suco de uva”**

A Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central considerou exeqüível a realização dos exames de laboratório relacionados ao seu projeto de pesquisa. Informamos que V.Sa. poderá iniciá-lo conforme seu cronograma, sendo que os pedidos de exames deverão ser preenchidos conforme modelo abaixo, a fim de evitarmos desvios nos resultados. **É FUNDAMENTAL QUE VSA PROVIDENCIE UM CARIMBO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SEU PROTOCOLO, conforme: PR-348 CARIMBADO EM TODOS OS PEDIDOS DE EXAME, DE PREFERÊNCIA, COM TINTA VERMELHA.**

No campo CLÍNICA: preencher com a palavra **LACE**

No campo PESQUISA: **PR 348**

Com carimbo vermelho: **PR 348**

Qualquer dúvida ou necessidade de esclarecimentos, contactar
Dr. Nairo M. Sumita, relator do projeto, nos telefones 3069-6117 e 3069-6116.

Exames:

Determinações previstas: 60 animais

Colesterol

HDL

Triglicérides

C/C

Bioquímica Coleta

Expedição de Laudos

Serviço Auxiliar Informática

Profª. Drª Leila Amâncio
Coordenadora da Comissão de Ensino e Pesquisa
Div. de Laboratório Central - FMUSP

Atenciosamente,

ANEXO 3 – LIMITES MICROBIOLÓGICOS PARA SORVETES

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	TOLERÂNCIA P/AMOSTRA INDICATIVA	TOLERÂNCIA P/AMOSTRA REPRESENTATIVA			
			n	C	m	M
a) Gelados comestíveis e produtos especiais gelados a base de leite e produtos lácteos	Coliformes a 45°C/g	5x10	5	2	10	5X10
	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) Gelados comestíveis e produtos especiais gelados, de base não láctea (água, suco de fruta) e similares	Coliformes a 45°C/g	5x10	5	2	10	5X10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) Base, em pó ou líquida, para preparo de gelados comestíveis	Coliformes a 45°C/g(mL)	10	5	2	5	10
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-

REFERÊNCIA:

- BRASIL. RDC nº 12, de 02/01/01. Aprova Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Of.COEP/ 82 / 08

Protocolo 1741

Projeto de Pesquisa EFEITO ANTIOXIDANTE DE SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO E DA PRODUÇÃO DE SUCO DE UVA

Pesquisador(a) Emilia Yasuko Ishimoto

26 de MARÇO de 2008.

Prezado(a) Orientador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP analisou, em sua 2.ª/08 Sessão ORDINÁRIA, realizada em 20/03/2008, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96 e suas complementares, o protocolo de pesquisa acima intitulado e o considerou **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO**.

O COEP/FSP recomenda que a pesquisadora inclua no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido os dados Institucionais (endereço, telefone, e-mail) deste CEP;

O COEP/FSP solicita ao pesquisador que depois de atendidas as recomendações, o novo termo seja encaminhado para arquivo deste COEP. Cabe informar que o termo encaminhado deverá vir com o campo "assinatura do pesquisador" assinado pelo mesmo.

Cabe lembrar que conforme Resolução CNS/196/96 são deveres do (a) pesquisador (a):

1. Comunicar, de imediato, qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa;
2. Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP, no caso eventual auditoria;
3. Comunicar, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto;
4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
5. Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP

Ilm.ª Sr.ª
Prof.ª Dr.ª ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

ANEXO 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO – ANÁLISE SENSORIAL**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Participação na Análise Sensorial** **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

Investigadores: Emília Yasuko Ishimoto e Prof. Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres. Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715. CEP 01246-904. São Paulo, SP.

Objetivo desta pesquisa: Avaliar a aceitabilidade sensorial de produtos derivados da uva.

Benefícios: Ao final da pesquisa, os pesquisadores tentarão transferir a tecnologia desenvolvida para empresas que fabricam sorvetes, sucos ou sobremesas à base de uva.

Riscos: Os produtos a serem experimentados foram fabricados sob rígidos controles de higiene, não oferecendo riscos à saúde. Foram realizadas análises microbiológicas dos produtos, e os resultados indicaram que estão adequados para consumo.

Compensações: Os provadores receberão um brinde como forma de agradecimento pela participação no estudo.

Confiabilidade: Será garantido total sigilo a respeito da participação dos provadores nesta pesquisa. Os resultados serão divulgados em eventos e periódicos científicos das áreas de nutrição e ciência e tecnologia de alimentos.

Direito de recusa ou desistência: O provador pode desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso ocasione quaisquer prejuízos. A desistência não acarretará qualquer problema no relacionamento com os pesquisadores e órgãos envolvidos no projeto.

Questões: Emília Yasuko Ishimoto, pesquisadora responsável por este estudo, discutiu estas informações comigo, oferecendo-se para responder minhas dúvidas. Caso tenha perguntas adicionais, poderei contatá-la pelo telefone (11) 3061 7748 ou e-mail: ishimoto@usp.br.

Participação na pesquisa: Se eu concordar em participar deste estudo, irei provar os produtos e responder à ficha de avaliação.

Consentimento: Eu, _____, concordo em participar desta pesquisa na qualidade de provador dos produtos. Recebi uma cópia do presente termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer dúvidas.

São Paulo, ____ de _____ de 2007.

Assinatura: _____

Emília Yasuko Ishimoto

Prof. Assoc. Elizabeth A.F.S.Torres

NOTA: Esta análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Saúde Pública/USP, localizado na Av. Dr. Arnaldo, 715, fone: 3082-0259, e-mail: coep@fsp.usp.br.

ANEXO 6 – FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome: _____ Idade: _____ anos

Com que frequência você consome sorvetes:

☐ diário	☐ semanal	☐ 15 dias	☐ mensal	☐ menos de 1 vez por mês
---------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	---

- Você está recebendo uma amostra de sorvete.
- Avalie cada atributo utilizando a escala correspondente.
- Assinale apenas uma alternativa para cada atributo.

Amostra : _____

<p style="text-align: center;">Cor</p> <p>☐ 1 - desgostei muitíssimo</p> <p>☐ 2 - desgostei muito</p> <p>☐ 3 - desgostei regularmente</p> <p>☐ 4 - desgostei ligeiramente</p> <p>☐ 5 - indiferente</p> <p>☐ 6 - gostei ligeiramente</p> <p>☐ 7 - gostei regularmente</p> <p>☐ 8 - gostei muito</p> <p>☐ 9- gostei muitíssimo</p>	<p style="text-align: center;">Textura</p> <p>☐ 1 - desgostei muitíssimo</p> <p>☐ 2 - desgostei muito</p> <p>☐ 3 - desgostei regularmente</p> <p>☐ 4 - desgostei ligeiramente</p> <p>☐ 5 - indiferente</p> <p>☐ 6 - gostei ligeiramente</p> <p>☐ 7 - gostei regularmente</p> <p>☐ 8 - gostei muito</p> <p>☐ 9- gostei muitíssimo</p>
<p style="text-align: center;">Sabor</p> <p>☐ 1 - desgostei muitíssimo</p> <p>☐ 2 - desgostei muito</p> <p>☐ 3 - desgostei regularmente</p> <p>☐ 4 - desgostei ligeiramente</p> <p>☐ 5 - indiferente</p> <p>☐ 6 - gostei ligeiramente</p> <p>☐ 7 - gostei regularmente</p> <p>☐ 8 - gostei muito</p> <p>☐ 9- gostei muitíssimo</p>	<p style="text-align: center;">Avaliação Global</p> <p>☐ 1- desgostei muitíssimo</p> <p>☐ 2 - desgostei muito</p> <p>☐ 3 - desgostei regularmente</p> <p>☐ 4 - desgostei ligeiramente</p> <p>☐ 5 - indiferente</p> <p>☐ 6 - gostei ligeiramente</p> <p>☐ 7 - gostei regularmente</p> <p>☐ 8 - gostei muito</p> <p>☐ 9- gostei muitíssimo</p>

Comentários _____

ANEXO 7 – FICHA DE AVALIAÇÃO DE PREFERÊNCIA

- Você está recebendo 2 amostras de sorvete.
- Prove da esquerda para a direita e assinale a da sua preferência.
- Assinale apenas uma amostra.

567

789

Comentários _____

ANEXO 8 – CROMATOGRAMA PADRÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

ANEXO 9 – CROMATOGRAMAS DE ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS - FBV (1) e FBS (2)

A-9

ANEXO 10 – CROMATOGRAMAS de ANÁLISE de ÁCIDOS GRAXOS DAS DIETAS CONTROLE (1) e HIPERLIPEMIANTE (2)

A-10

ANEXO 11 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA – SORBET de FBV

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº FI020029-06M

Food
Intelligence**Empresa solicitante:** Emilia Ishimoto**Unidade:****Endereço:** Rua Vito Bovino, 331**Bairro:****CEP:** 04677-001**Município:** São Paulo**Estado:** SP**Dados da Amostra:** Produto Acabado**Condições da amostra:** Congelado**Identificação da amostra:** Sorbet de Uva Com BV Liofilizado**Lote:** 6034**Código do produto F.I.:** FI020029**Data de entrada:** 13/12/06**Data início análise:** 13/12/06**Data término análise:** 17/12/06

Análise Microbiológica	Especificação	Resultado
Contagem Padrão em Placas	-----	7,2.10 ² UFC/g
Bolores e Leveduras	-----	2,3.10 ² UFC/g
Coliformes Fecais UFC	-----	< 10 UFC/g
Coliformes Totais UFC	-----	< 10 UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

Observações :

- Os resultados obtidos referem-se exclusivamente à amostra enviada pelo interessado.

Metodologias :

- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – Fourth Edition 2001 (APHA)
- AOAC Official Method of Analysis - Edition, 17th Edition, 2000.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2007.

 Manderlyn A. Mano – CRF 4917
 Gerente Lab. Microbiologia

 Michelle Sieiro Fernandes
 Conferente
 CRBio-1Nº 31479/01-D

PÁGINA 1 DE 1

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº FI021008-06M

Food Intelligence**Empresa solicitante:** Emilia Ishimoto**Unidade:****Endereço:** Rua Vito Bovino, 331**Bairro:****CEP:** 04677-001**Município:** São Paulo**Estado:** SP**Dados da Amostra:** Produto Acabado**Condições da amostra:** Congelado**Identificação da amostra:** Sorbet Uva Com BS Liofilizado**Lote:** 6045**Código do produto F.I.:** FI021008**Data de entrada:** 27/12/06**Data início análise:** 27/12/06**Data término análise:** 31/12/06

Análise Microbiológica	Especificação	Resultado
Contagem Padrão em Placas	-----	$1,1.10^2$ UFC/g
Bolores e Leveduras	-----	$5,8.10^2$ UFC/g
Coliformes Fecais UFC	-----	< 10 UFC/g
Coliformes Totais UFC	-----	< 10 UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

Observações :

- Os resultados obtidos referem-se exclusivamente à amostra enviada pelo interessado.

Metodologias :

- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – Fourth Edition 2001 (APHA)
- AOAC Official Method of Analysis - Edition, 17th Edition, 2000.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2007.

Manderlyn A. Mano – CRF 4917
Gerente Lab. Microbiologia Michelle Sieiro Fernandes
Conferente
CRBio-1Nº 31479/01-L

ANEXO 13 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA – PICOLÉ de FBS

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº FI021009-06M

Food
Intelligence**Empresa solicitante:** Emilia Ishimoto**Unidade:****Endereço:** Rua Vito Bovino, 331**Bairro:****CEP:** 04677-001**Município:** São Paulo**Estado:** SP**Dados da Amostra:** Produto Acabado**Condições da amostra:** Congelado**Identificação da amostra:** Picolé Uva Com BS Liofilizado**Lote:** 6046**Código do produto F.I.:** FI021009**Data de entrada:** 27/12/06**Data início análise:** 27/12/06**Data término análise:** 31/12/06

Análise Microbiológica	Especificação	Resultado
Contagem Padrão em Placas	-----	$1,4.10^2$ UFC/g
Bolores e Leveduras	-----	$1,0.10^3$ UFC/g
Coliformes Fecais UFC	-----	< 10 UFC/g
Coliformes Totais UFC	-----	< 10 UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

Observações :

- Os resultados obtidos referem-se exclusivamente à amostra enviada pelo interessado.

Metodologias :

- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – Fourth Edition 2001 (APHA)
- AOAC Official Method of Analysis - Edition, 17th Edition, 2000.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2007.

Manderlyn A. Mano – CRF 4917
Gerente Lab. Microbiologia

Michelle Sieiro Fernandes
Conferente
CRBio-1Nº 31479/01-D

PÁGINA 1 DE 1

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº FI020030-06M

Food
Intelligence**Empresa solicitante:** Emilia Ishimoto**Unidade:****Endereço:** Rua Vito Bovino, 331**Bairro:****CEP:** 04677-001**Município:** São Paulo**Estado:** SP**Dados da Amostra:** Produto Acabado**Condições da amostra:** Congelado**Identificação da amostra:** Picolé de Uva Com BV Liofilizado**Lote:** 6035**Código do produto F.I.:** FI020030**Data de entrada:** 13/12/06**Data início análise:** 13/12/06**Data término análise:** 17/12/06

Análise Microbiológica	Especificação	Resultado
Contagem Padrão em Placas	-----	6,1.10 ² UFC/g
Bolores e Leveduras	-----	1,5.10 ² UFC/g
Coliformes Fecais UFC	-----	< 10 UFC/g
Coliformes Totais UFC	-----	< 10 UFC/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

Observações :

- Os resultados obtidos referem-se exclusivamente à amostra enviada pelo interessado.

Metodologias :

- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – Fourth Edition 2001 (APHA)
- AOAC Official Method of Analysis - Edition, 17th Edition, 2000.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2007.

Manderlyn A. Mano – CRF 4917
Gerente Lab. Microbiologia Michelle Sieiro Fernandes
Conferente
CRBio-1Nº 31479/01-D

**ANEXO 15 – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE DO
PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FARINHA DE BAGAÇO DE UVA**

A-15

Processo nº	<u>07.1.266.6.8</u>
Status:	
Abertura:	13/03/2007 13:12 (SCEXP-06)
Interessado:	ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES
Documento Base:	HNT/2007/EAFT
Classificação:	Depósito de patente
Complemento:	"FARINHA DE BAGACO (CASCA E SEMENTE) DE SUCO DE UVA E VINHO COMO INGREDIENTES PARA ELABORACAO DE ALIMENTOS FUNCIONAL"
Entrada :	AG USP INOVAÇÃO 26/03/2007 16:13 <u>5502318</u>

ANEXO 16 – Artigo enviado para publicação – *Journal of Food Composition and Analysis* – Outubro/2007

WINE AND GRAPE JUICE BYPRODUCTS AS A SOURCE OF FUNCTIONAL COMPOUNDS: SENSORY EVALUATION OF GRAPE POMACE SORBET

EMÍLIA Y. ISHIMOTO*, ANDRÉA C.G. MATIAS, ALDO BACCARIN; DEBORAH H.M.BASTOS; ELIZABETH A.F.S. TORRES. Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, Brazil. *e-mail: ishimoto@usp.br

address: Rua Vito Bovino, nº 331 – Jardim Campinas, São Paulo – SP, Brazil

CEP 04677-001; Phone number: (11) 5631-3815

Abstract

By-products of plant food processing represent a major disposal problem for the industry. Grape pomace (GP) is the more important grape byproduct, which amounts to more than 9 million tons per year. On the other hand, GP represents a good source of bioactive compounds like polyphenols and fiber, which are known as preventive agents against degenerative diseases. **Objective:** To evaluate GP of two different grape varieties as a potential ingredient to elaborate a food product. **Materials and methods:** Red GP were supplied from a winery and a fruit juice company, respectively. Then, the samples were freeze-dried, milled and sifted and the composition was determined. Grape juice sorbet (GJS) and grape wine sorbet (GWS) were submitted to a 43-member sensory panel to assess the sensory attributes and overall acceptance (OA). **Results:** Mean values of both flour composition were: moisture 6.4%, protein 9.2%, ashes 2.5%, fat 5.9%, non-fiber carbohydrate 11.9%, dietary fiber 64.1%. Total phenolics were 0.2 and 0.4 mg/g for GW and GJ flour, respectively. With regard to sensory evaluation, both formulations were well accepted, even though GJS presented better results. **Conclusion:** It is possible to use GP as an ingredient to make high phenolics and fiber sorbet with acceptable sensorial attributes.

Keywords: grape by-products, red wine, grape juice, antioxidant polyphenols, fiber, sorbet.

1 – Introduction

Epidemiological studies have indicated that consumption of fruits and vegetables imparts health benefits (Heimendinger and Chapelsky, 1996). The antioxidants present in fruits and vegetables have been shown to be a class of bioactive compounds that are capable of preventing or delaying the rate of oxidation, a free radical chain reaction that takes place in autoxidizable materials.

After oranges, grapes (*Vitis* sp., Vitaceae) are the world's largest fruit crop with more than 60 million tons produced annually. About 80% of the total crop is used in winemaking (Mazza and Miniati, 1993), and pomace represents approximately 20% of the weight of grapes processed. From these data, it can be calculated that grape pomace production amounts to more than 9 million tons per year. A figure of five to seven million tons has been reported by other authors (Meyer et al., 1998). Its composition varies considerably, depending on grape variety and winemaking technology. A great range of products such as ethanol, tartrates, citric acid, grape seed oil, hydrocolloids, and dietary fiber are recovered from grape pomace (Bravo and Saura-Calixto, 1998; Valiente et al., 1995). Anthocyanins, catechins, flavonol glycosides, phenolic acids and alcohols and stilbenes are the principal phenolic constituents of grape pomace. Anthocyanins have been considered to be the most valuable components, and methods for their extraction have been reported (Mazza, 1995).

Since grape and red wine phenolics have been demonstrated to inhibit the oxidation of human low-density lipoproteins (Frankel et al., 1996), a large number of investigations on the recovery of phenolic compounds from grape pomace have been started. From a nutritional point of view, these phenolics are highly valuable since they are absorbed to a large extent (Martin-Carron et al., 1997). Grape seeds are rich sources of polyphenolics, especially procyanidins, which have been shown to act as strong antioxidants and provide health-promoting effects (Jayaprakasha et al, 2001; Saito et al, 1998). Due to increasing production, disposal is a growing problem since the plant material is usually prone to microbial spoilage, thus limiting further exploitation. On the other hand, this material is also a promising source of compounds that can be used because of their favorable technological and nutritional properties (Schieber et al., 2001). Moreover, consumers are increasingly aware of diet-related health problems and are therefore demanding natural ingredients, which are expected to be safe and health-promoting. Grape pomace is the final residue from juice and wine agroindustrial processing, and it often utilized as cattle feed or fertilizer. There has been little research on the use of winemaking or grape juice byproducts as ingredients in the development of

food products, or on their sensory evaluation. Hence, the objective of this work was to evaluate the consumer acceptability of a sorbet made with grape byproducts, in relation to its sensory attributes (appearance, flavor, texture and overall acceptability), by means of hedonic scoring.

2 - Materials and Methods

2.1 Preparation of grape pomace flour

Pomace (skins and seeds) from two different varieties of grapes was used. The material was purchased from a winemaking company and a grape juice company, as described in Table 1.

Firstly, the pomace was freeze-dried for approximately 72 hours at -60°C . Then the samples were crushed and sifted, in order to standardize the particles to a size smaller than 0.42 mm (35 Tyler). Finally, the flour obtained packed and stored, as shown in Figure 1.

2.2 Composition of grape flour

The composition of both flours was determined according to the AOAC methods (1993), and the fiber contents – soluble and insoluble fraction – were measured through an enzymatic-gravimetric method (Prosky et al., 1988).

The Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton and Rossi, 1965) was used to determine the total phenolic contents, calibrating against gallic acid standards. Thus, the results are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g flour. All assays were conducted in triplicate.

2.3 Sorbet Formulation

Considering that some grape phenolic compounds are sensitive to high temperatures (Larrauri et al., 1998), we chose to make a product for which the preparation process does not include high temperatures. The sorbet was developed using flour from both types of pomace, JP (juice pomace) and WP (wine pomace), in partnership with a food company, in a pilot plant. Grape juice sorbet (GJS) and grape wine sorbet (GWS) were kept at -18°C until sensory evaluation was performed.

2.4 Experimental Design

The sensory evaluation was approved by the Research Ethics Committee of the School of Public Health, and the purposes of the study were explained to the participants. Although they were not given the nutritional composition, they were told that grapes were part of the sorbet formulation.

The sensory test was conducted in the Sensory Analysis Laboratory of the Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, on November 26, 2006, during the morning (9:30 am to 10:30 am), under controlled conditions (isolated booths, under fluorescent lighting). Water was supplied to cleanse the palate between samples. Forty-three untrained tasters participated in the study, including students, teachers and university employees. Thirty-one of them were women and twelve were men. They were invited to voluntarily participate in the study, and the means of communication was the Internet and posters displayed in different locations around the university.

The mean age of the consumers was 31.14 ± 11.97 years. They were separated into three categories according to their ages: 9 to 25 (46.5%); 26 to 39 (27.9%); and up to 40 years (25.6%). The tasters were provided with two coded sorbets in random order: one GWS and one GJS. Taster acceptance testing was done using a nine-point hedonic scale for sensory evaluation (9 = “like extremely”; 8 = “like very much”; 7 = “like moderately”; 6 = “like slightly”; 5 = “neither like nor dislike”; 4 = “dislike slightly”; 3 = “dislike moderately”; 2 = “dislike very much”; 1 = “dislike extremely”) to rate the sorbets for appearance, flavor, texture and overall acceptability, as described by Peryam and Girardot (1952). The tasters were also asked to point out his/her preferred sorbet.

2.5 Statistical Analysis

Descriptive statistics, including frequencies, percentages and range were calculated for scorecard ratings. Means, standard deviations (SD) and standard errors (SE) were calculated for each of the sensory attributes. The mean differences between the tasters gender and age were tested using t-Student test and one way ANOVA/Tukey, respectively. Correlations between overall acceptability and other sensory attributes were calculated, and coefficients of determination were reported. All test analysis was performed using the software SPSS 13.0, for Windows, and the values lower than $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3 – Results and Discussion

The composition of both flours (wine pomace and juice pomace flour) is presented in Table 2.

Total phenolics were 0.2 mg/GAE/g for wine pomace flour and 0.4 mg/GAE/g for juice pomace flour.

As shown in Table 3, 5% of the pomace flour was added, for both formulations.

The results of sensory evaluation are presented in tables 4, 5 and 6.

Both formulations were well accepted, even though, in general, GJS presented better results (Table 4). There was no significant difference between tasters' gender and age on overall acceptability (Table 5).

Scale values within the range from 6 to 9 were considered to represent approval. Thus, the overall acceptance (OA) for GJSP and GWS sorbet was 7.1 ± 1.8 and 6.1 ± 1.9 (mean $\pm$ SD), respectively. Concerning the other attributes (color, texture and flavor), 84% of the ratings for GJS and 60% for GWS were within the approval range.

As shown in Table 6, texture and flavor presented a good correlation to overall acceptability for both samples, and color presented the weaker correlation. These data indicate that texture and particularly flavor influenced the most in the approval of the sorbets' sensory attributes.

In addition to this sensory analysis, a study with an experimental design using an animal model (male hamsters) is now being conducted in order to evaluate the physiological effects on lipid metabolism and antioxidant status. The experimental protocol includes the administration of both flours cited, in aqueous extract and diet supplementation form.

4 – Conclusion

The sensory evaluation showed that it is possible to use grape pomace as an ingredient to make a sorbet with high phenolic and fiber content and acceptable sensory attributes, with the advantage of a very low cost ingredient.

The evaluation of bioactive compounds stability in grape pomace under different conditions, such as heating may be of importance, particularly for the phenolic compounds. To clarify these questions, further studies need to be conducted using different preparations.

Acknowledgments

FAPESP, Food Intelligence, Dr. Elizabeth Machado Pinto e Silva and all the participants in this study.

5 – References

- Association Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis. Washington, 1993.
- Bravo, L., Saura-Calixto, F., 1998. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 135–141.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P.L., 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 890–894.
- Heimendinger, J., Chapelsky, D., 1996. The national 5 a day for better health program. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 401, 199–206.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., Sakariah, K. K., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry* 73, 285–290.
- Larrauri, J. A., Sanchez-Moreno, C., Saura-Calixto, F., 1998. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2694–2697.
- Martin-Carron, N., Garcia-Alonso, A., Goni, I., Saura-Calixto, F., 1997. Nutritional and physiological properties of grape pomace as a potential food ingredient. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 328–332.
- Mazza, G., Miniati, E., 1993. Grapes. In *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains* (pp. 49–199). Boca Raton, Ann Harbor, London, Tokyo: CRC Press.
- Mazza, G., 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 341–371.
- Meyer, A. S., Jepsen, S. M., Soerensen, N. S., 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2439–2446.
- Peryam, D. R., Girardot, N. F., 1952. Advanced taste test method. *Food engineering* 24 (7), 58–61.
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., de Vries J.W., Furda, I., 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study. *Journal of the Association Official Analytical Chemists (JAOAC)* 71, 1017–1023.
- Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S., Yamaji, N., 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1460–1464.
- Schieber, A., Stintzingand, F.C., Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science and Technology* 12, 401–413.
- Singleton, V.L., Rossi, J.R., 1965. Colorimetry of total phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic acid. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
- Valiente, C., Arrigoni, E., Esteban, R. M., Amado, R., 1995. Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of Food Science* 60, 818–820.

ANEXO 17 – Artigo enviado para publicação – *Acta Horticulturae*

Novembro/2007

FORMULATING FUNCTIONAL POPSICLE WITH WINE AND GRAPE JUICE BY-PRODUCTS

E.Y.Ishimoto¹, V.D. Capriles², A.G.Matias³, A.Baccarin⁴, E.A.F.S. Torres⁵.

1,2,3 and 5) School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; 4) Food Intelligence-Consultoria Técnica em Alimentos S/C Ltda, São Paulo, Brazil.

Keywords: grape pomace juice, grape pomace wine, phenolic antioxidants, dietary fiber, sensory acceptability.

ABSTRACT

Grape pomace (GP) is the most important by-product of wine and grape juice production, and is also a good source of bioactive compounds, especially phenolic antioxidants and fiber. Therefore, GP can be considered a cheap source of functional ingredients, and its use can also reduce the environmental impact. Red GP (skin and seeds) were supplied by a winery and a fruit juice company, providing Cabernet Sauvignon and Izabel grape varieties, respectively. The samples were freeze-dried, milled and sifted in order to obtain the pomace flours. Pomace flours were used in 5% of the formulation for elaborate grape pomace juice popsicle (GPJP) and grape pomace wine popsicle (GPWP). The instrumental color parameters and sensory acceptability of this popsicles were assessed. GPJP presented lower total color difference ($\Delta E=8.50$) than GPWP ($\Delta E=12.76$) in relation to a market available popsicle made with grape juice. This result was responsible for GPJP higher color acceptability (7.81 ± 1.19), when compared to GPWP (5.98 ± 2.30). Also, texture, flavor and overall acceptability of GPJP (6.81 ± 1.47 , 6.96 ± 1.52 , 6.94 ± 1.31) were significant higher than GPWP (5.02 ± 2.27 , 5.51 ± 2.09 , 5.28 ± 2.03). GPJP was significantly preferred ($p < 0.01$) regarding the sensory attributes. Total dietary fiber contents of the developed products is approximately 2,0 g/portion (1 popsicle unit or 60 g), while a market commercial popsicle in Brazil presents no significant amount in this nutrient (the fiber contents is not declared on the label). The results of this first use of grape by-products in food product development reveal a viability of using grape juice by-products as an ingredient to make high phenolics and fiber popsicles with high sensory acceptability.

INTRODUCTION

The antioxidants present in fruits and vegetables have been shown to be a class of bioactive compounds that are capable of preventing or delaying the rate of oxidation, a free radical chain reaction that takes place in autoxidizable materials. Grape seeds are rich sources of polyphenolics, especially procyanidins, which have been shown to act as strong antioxidants and provide health-promoting effects (Jayaprakasha et al, 2001).

Grape pomace, the final residue from juice and wine agroindustrial processing, is often utilized as cattle feed or fertilizer. However, it is a promising source of compounds that can be used because of their favorable technological and nutritional properties (Schieber et al., 2001). Moreover, consumers are increasingly aware of diet-related health problems and are therefore demanding foods that combine pleasant sensory attributes with natural and healthy ingredients (Sloan, 1998). There has been little research on the use of winemaking or grape juice byproducts as ingredients in the development of food products, or on their sensory evaluation. Hence, the objective of this work was producing popsicle with grape by-products and to evaluate its nutritional value and sensory acceptability.

MATERIALS AND METHODS

Pomace (skins and seeds) from two different varieties of grapes was used (Table 1). Firstly, the pomace was freeze-dried, then crushed and sifted (particles smaller than 0.42 mm). The resulting flour was kept at -18°C prior to further use. Fiber contents of both flours were analyzed using the enzymatic-gravimetric method (Prosky et al, 1988). The Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965) was used to determine the total phenolic contents, calibrating against gallic acid standards. The popsicles were developed using 5% of flour, in a pilot plant according to the formulae in Table 2.

A reflectance spectrophotometer (Color Quest II, Hunter Lab, USA) was used to measure the color of grape pomace juice and wine flours and popsicles color parameters by means of L^*

(lightness/darkness), a^* (redness/greenness) and b^* (yellowness/blueness). The total color difference between the commercial and the developed popsicles was calculated as follow: $\Delta E = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2}$.

Forty-three untrained tasters (31 females and 12 males, aged from 25 to 40 years) participated on the sensory evaluation, assessing color, texture, flavor, and overall acceptability of the popsicles on a 9-point hedonic scale, 1 = dislike extremely, 5 = neither like nor dislike, 9 = like extremely (Stone and Sidel, 1985). Samples were placed on white plates and identified with random 3-digit numbers. Tasters evaluated the samples in a testing area, and were instructed to rinse their mouths with water between samples to minimize any residual effect. The tasters were also asked to point out their preferred popsicle.

The results were expressed by means of values $\pm$ standard deviations. Student's *t* test was performed to compare the means of sensory acceptability data. Comparison of means of color data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Statistical analyses were run using the SPSS 13.0 software (SPSS Institute Inc., Cary, NC) with significance defined at the $P < 0.05$. The paired preference results were analyzed through binomial probability tables (Ferreira et al 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

GJP flour presented 7.8% (± 0.19), and 41.7% (± 0.49), of soluble and insoluble dietary fiber, while GWP presented 6.5% (± 0.09), and 59.2% (± 0.78), respectively. Total phenolics were 0.2 mg/GAE (Gallic Acid Equivalent)/g for wine pomace flour and 0.4 mg/GAE/g for juice pomace flour. These data reveal that grape pomace (GP) is a good source of dietary fiber and phenolic antioxidants. Therefore, GP can be considered a cheap source of functional ingredients. The fiber contents of popsicles were estimated through GJP and GWP flour composition. Total dietary fiber contents of the developed products is approximately 2,0 g/portion (1 popsicle unit or 60 g), while a market commercial popsicle in Brazil presents no significant amount in this nutrient (the fiber contents is not declared on the label).

The color parameters of GJP and GWP flours, GPJP (grape juice pomace popsicle) and GWPP (grape wine pomace popsicle) and commercial popsicle are presented in Table 3. GPJP presented lower total color difference ($\Delta L^*=4.82$, $\Delta a^*=-6.91$, $\Delta b^*=-1.09$, $\Delta E_{ab}=8.50$) than GPWP ($\Delta L^*=-9.19$, $\Delta a^*=-8.84$, $\Delta b^*=-0.65$, $\Delta E_{ab}=12.76$) in comparison to a market available popsicle made with grape juice. GPWP presented a darker color than a commercial product. This striking difference was due to GWP flour color, which is darker than GJP flour, as shown in Table 3. This result was responsible for GPJP higher color acceptability (Table 4). Also, texture, flavor and GPJP overall acceptability were significant higher than GPWP.

Muñoz et al. (1992) considered that an acceptability score of 6 on a 9-point hedonic scale would be a commercial or quality limit. Using this acceptability score as a failure criterion, only GPJP was acceptable and has great commercial potential. 100%, 87%, 89% and 89% of the tasters assigned overall acceptability scores greater than or equal to six for color, texture, flavor and overall acceptability of GPJP. 79% of the tasters preferred GPJP than GPWP. This result showed GPJP was significantly preferred ($P < 0.01$).

CONCLUSIONS

This study showed that is feasible to use grape juice pomace as an ingredient to make a popsicle with high phenolic and fiber content and acceptable sensory attributes, with the advantage of a very low cost ingredient. Thus, the approach developed may be considered an alternative process for popsicle production.

The evaluation of bioactive compounds stability in grape juice and wine pomace under different conditions, such as heating and storage time may be of importance, particularly for the phenolic compounds. To clarify these questions, further studies need to be conducted using different preparations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially support by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). We also would like to address our thanks to Vinícola Miolo Ltda - Brazil and Produtos Alimentícios Superbom Ind. e Com. Ltda - Brazil for supplying the pomaces, Food Intelligence Consultoria Técnica em Alimentos Ltda - Brazil for elaborating the popsicles, and Dr. Maria Elizabeth M.P.Silva, for conceding the sensory test area. These new food products have been patented by Universidade de São Paulo, Brazil.

Literature Cited

Ferreira, V.L.P.; Almeida, T.C.A.; Pettinelli, M.L.C.; Silva, M.A.A.P.; Chaves, J.B.P.; Barbosa, E.M. Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. Campinas: SBCTA, 2000.

- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., Sakariah, K. K., 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem* 73, 285–290.
- Muñoz, A.M., Civile, V.G., Carr, B.T., 1992. Sensory evaluation in quality control. Van Mostrand, Reinhold.
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., DeVries, J.W., Furda, I., 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: intralaboratory study. *JAOACs* 71, 1017-1023.
- Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source functional compounds-recent developments. *Trends Food Sci Tech* 12, 401-413.
- Singleton, V.L., Rossi, J.R., 1965. Colorimetry of total phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic acid. *Am J Enol Vitic* 16, 144-158.
- Sloan, A.E., 1998. Food industry forecast: consumer trends to 2000 and beyond. *Food Techn* 52, 37-44.
- Stone, H., Sidel, J.L., 1985. *Sensory Evaluation Practices*. Academic Press, London.

Tables

Table 1. Species, variety and provenience of grape pomaces.

Product	Grape species	Grape variety	Harvest year
Grape wine pomace (GWP)	<i>Vitis vinifera</i>	Cabernet Sauvignon	2005
Grape juice pomace (GJP)	<i>Vitis labrusca</i>	Izabel	2006

Table 2. Grape pomace popsicle formulation

Ingredients	Grape pomace juice popsicle		Grape pomace wine popsicle	
	Amount/batch	Formulation	Amount/batch	Formulation
Potable water	957.315 mL	73.6396 %	839.491 mL	73.6396 %
Crystallized sugar	234.000 g	18.0000 %	205.200 g	18.0000 %
Corn glucose syrup	39.000 g	3.0000 %	34.200 g	3.0000 %
Xantana gum	1.430 g	0.1100 %	1.254 g	0.1100 %
Grape pomace flour	65.000 g	5.0000 %	57.000 g	5.0000 %
Citric acid	3.120 g	0.2400 %	2.736 g	0.2400 %
Bright blue dye	0.005 g	0.0004 %	0.005 g	0.0004 %
Bordeaux red dye	0.130 g	0.0100 %	0.114 g	0.0100 %

Table 3. Comparison of grape pomace and commercial popsicles color parameters.

Sample	Color parameters		
	L*	a*	b*
Grape pomace juice flour	29.94 ^b ± 0.14	17.01 ^a ± 0.03	6.61 ^a ± 0.07
Grape pomace wine flour	32.96 ^a ± 0.13	11.04 ^c ± 0.03	5.75 ^b ± 0.07
Grape pomace juice popsicle	32.86 ^a ± 0.57	5.75 ^d ± 0.14	-0.07 ^e ± 0.02
Grape pomace wine popsicle	18.86 ^d ± 0.42	3.83 ^c ± 0.16	0.37 ^d ± 0.00
Market available popsicle	28.04 ^c ± 0.55	12.67 ^b ± 0.17	1.02 ^c ± 0.12

Values are means ± standard deviation. Means in the same column that do not share the same letter are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Popsicles acceptability prepared with grape juice and wine pomaces.

Sample	Color	Texture	Flavor	Overall
Grape pomace juice popsicle	7.81 ^a ± 1.19	6.81 ^a ± 0.47	6.96 ^a ± 1.52	6.94 ^a ± 1.31
Grape pomace wine popsicle	5.98 ^b ± 2.30	5.02 ^b ± 2.27	5.51 ^b ± 2.09	5.28 ^b ± 2.03

Values are means ± standard deviation. Means in the same column that do not share the same letter are significantly different ($P < 0.05$).