Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Bebida à base de subproduto da uva: efeitos sobre
o estresse oxidativo e marcadores de risco de
doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis**

Marcela Piedade Monteiro

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

Área de concentração: Nutrição
em Saúde Pública.

Orientadora Prof^a Dr^a Elizabeth
A. F. S. Torres

São Paulo
2011

Bebida à base de subproduto da uva: efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis

Marcela Piedade Monteiro

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

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública.

Orientadora Prof^a Dr^a Elizabeth A. F. S. Torres

São Paulo

2011

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

AGRADECIMENTOS

É impossível expressar com palavras toda a minha gratidão as várias pessoas que me ajudaram na construção deste trabalho. Assim, deixarei aqui registrado pelo menos um muito obrigada.

A Prof^a Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres pela oportunidade, confiança e orientação. Pela disposição em sempre procurar um novo caminho para a concretização desse estudo.

A Prof^a Sandra Vivolo pelas valiosas sugestões fornecidas no exame de qualificação e enorme contribuição na fase de pré-banca.

A Prof^a Elisabeth Machado pela disponibilização do laboratório de Técnica Dietética e importantes considerações e correções na pré-banca.

Ao Dr Lu pela cuidadosa leitura e considerações na pré-banca.

A Dr^a Liania Luzia pela contribuição durante a realização do trabalho e criteriosa correção na fase da pré-banca, mas, sobretudo pela amizade e exemplo de vida.

A Prof^a Vanessa Capriles por acreditar e incentivar esse estudo quando ainda era somente uma idéia, pela ajuda constante e importantes sugestões na pré-banca.

Ao Prof. Marcelo Ribeiro e Demetrius pela colaboração e parceria na realização de análises.

À Dra. Edna Nakandakare, Rodrigo Iborra e Valéria Nunes pela valiosa contribuição na técnica de isolamento de LDL.

A Rosana Soares e Geni Sampaio por tudo. Acolhida no laboratório, ajuda nas análises, amizade... faltam palavras.

A Yara Queiroz por estar sempre presente, ajuda incondicional. Uma colega de trabalho exemplar, uma amiga que é uma verdadeira irmã. Agradeço também ao Neilson e Giovanna.

A Marina pelo *help* sempre que precisei e amizade.

Aos companheiros de laboratório, Ana Paula Santos, Cecília, Daniela, Emília, Érica, Fernanda, Julianna, Malu, Mariana, Tatiana, Tatiane, Sílvio e, principalmente, Carol Martins, Pati Beleza, Thaíse e Telma pelo aprendizado constante e agradáveis momentos de descontração.

Às amigas Ana Paula Martins e Larissa por todo apoio.

A Liotécnica Tecnologia em Alimentos e Produtos Alimentícios Superbom Indústria e Comércio Ltda pela gentileza em liofilizar e fornecer as matérias-primas deste estudo, respectivamente.

Ao Sr. Aldo Baccarin da Food Intelligence - Consultoria Técnica em Alimentos S/S Ltda pela importantíssima contribuição no desenvolvimento e fabricação do principal produto deste trabalho.

A Prof^a Ana Cristina Tanaka pela disponibilização do Centro de Saúde Escola Prof. Geraldo de Paula Souza – FSP e, especialmente ao farmacêutico Milton e demais funcionários do Laboratório de Análises Clínicas.

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

Às voluntárias, todas dedicadas e responsáveis, sem as quais não seria possível a realização deste estudo.

Agradeço o apoio, confiança e incentivo dos meus pais, Vilma e Marcelo, do Gabriel, maninho querido e do amor Eduardo.

A Maria Eduarda que me deu a força que eu precisava para continuar e razão para acreditar que tudo vale a pena.

Meu muito obrigada a todos que estiverem presentes de algum modo nesta caminhada.

Resumo

Monteiro MP. Bebida à base de subproduto da uva: efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis. [Tese de Doutorado em Ciências] São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

Introdução: Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de vinho, produtos de uva e outros alimentos contendo polifenóis está associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Na produção de vinhos e suco de uva são geradas quantidades expressivas de bagaço residual, que é prejudicial ao meio ambiente. Por outro lado, este subproduto possui alto teor de antioxidantes e de fibras. **Objetivo:** Produzir uma bebida à base de farinha de bagaço de uva proveniente do processamento de suco de uva (FBSU) e avaliar seus efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco para doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis. **Métodos:** A bebida de FBSU e um suco comercial de uva (usado como controle no estudo *in vivo*) foram avaliados : sensorialmente por escala hedônica de 9 pontos; composição proximal segundo a AOAC; características físico-químicas; compostos fenólicos totais por Folin, capacidade antioxidante: (a) absorbância de oxigênio radical - ORAC, (b) capacidade antioxidante total - TAS, (c) capacidade de sequestrar o radical DPPH e (d) sistema β -caroteno/ácido linoléico. Sujeitos: mulheres saudáveis (n=15) foram randomizadas em um estudo clínico *crossover*, controlado, com quatro períodos de duas semanas de duração. Após *washout*, forneceu-se bebida de FBSU e suco de uva comercial, intercalados com outro *washout*. Quantificou-se triglicérides, colesterol total e suas frações, proteína C-reativa, IL-6, TNF- α e MCP-1. A LDL foi submetida à oxidação e em seguida medidos os produtos de peroxidação lipídica. TAS e ORAC do plasma foram determinados. Nos eritrócitos, foram analisadas as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT). Realizou-se o ensaio cometa nos linfócitos. O consumo das voluntárias foi avaliado por diário alimentar de 3 dias durante a intervenção com a bebida de FBSU, com o suco comercial e no *washout*. **Resultados:** Produto de FBSU recebeu, em média, nota seis para todos os parâmetros analisados sensorialmente. As notas do suco

comercial foram em média sete. A composição proximal em base seca da bebida de FBSU foi 10,1% de proteínas, 11,1% de lipídios e 76,3% de carboidratos. O teor de compostos fenólicos variou de 46,5 a 95,8 µg/mg EAG (equivalentes de ácido gálico) nos extratos: aquoso, etanólico e acetônico da bebida de FBSU. Nos extratos do suco comercial, foi de 2,00 a 4,80 µg/mg EAG. Extratos da bebida de FBSU apresentaram quantidades de fenólicos significativamente maiores do que os do suco comercial. Nas análises de capacidade antioxidante realizadas, os extratos da bebida de FBSU apresentaram valores significativamente maiores do que aqueles do suco comercial. Nas mulheres, não foi verificada alteração significativa nas concentrações de colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c e triglicérides durante o estudo. Valores de proteína C-reativa, IL-6, TNF- α e MCP-1 não apresentaram diferença significativa antes e após as intervenções. Não houve mudança significativa na fase *lag time* de oxidação do plasma nos momentos estudados. A capacidade antioxidante do plasma só aumentou significativamente no teste ORAC para intervenção com a bebida de FBSU. As atividades das enzimas SOD, GSH-Px e CAT não diferiram significativamente em ambos os grupos. O consumo da bebida de FBSU reduziu o dano oxidativo ao DNA nos linfócitos. A média do consumo alimentar foi estatisticamente igual nos três períodos avaliados. **Conclusões:** A bebida desenvolvida à base de FBSU foi aceita sensorialmente e apresentou capacidade antioxidante nas análises *in vitro*. A quantidade de 300 mL/dia desta bebida por 14 dias aumentou significativamente a capacidade antioxidante do plasma, avaliada pelo teste ORAC, e protegeu de danos oxidativos o DNA de linfócitos de mulheres saudáveis. Outros parâmetros de balanço redox e biomarcadores de risco de doenças cardiovasculares não foram influenciados.

Descritores: uva, subproduto, antioxidante, peroxidação lipídica, biomarcadores inflamatórios, doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Introduction: Epidemiological studies suggest that consumption of wine, grape products and other foods containing polyphenols is associated with decreased risk of cardiovascular disease. In the production of wine and grape juice significant amounts of pomace flour are generated, which is harmful to the environment. Moreover, this byproduct is high in antioxidants and fiber. **Objectives:** To develop a beverage using grape pomace flour (GPF) from grape juice and to evaluate its effect on oxidative stress and inflammatory biomarkers for cardiovascular disease risk in healthy women. **Methods:** GPF beverage and a commercial grape juice (used as control in the *in vivo* study) were sensory evaluated using the 9-point hedonic scale and had the proximal composition determined using the AOAC methods; physicochemical characteristics were analysed; total phenolics compound were quantified with the Folin-Ciocalteu reagent; antioxidant capacity was determined by different methods: (a) oxygen radical absorbance capacity assay - ORAC, (b) total antioxidant status - TAS, (c) radical scavenging activity (DPPH) assay, (d) β -carotene and linoleic acid system). Fifteen healthy women were randomized in a crossover clinical study, controlled with four periods of two weeks duration. It started with washout, followed by GPF beverage and commercial grape juice, interspersed with another washout. We evaluated triglycerides, total cholesterol and its fractions, C-reactive protein, IL-6, TNF- α and MCP-1. The LDL was subjected to oxidation and then measured the lipid peroxidation products. TAS and ORAC of the plasma were determined. In erythrocytes, the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) were analyzed. We carried out the comet assay in lymphocytes. We evaluated the dietary intake of volunteers in three separate stages during the intervention with GPF beverage, with commercial juice and washout. **Results** GPF beverage received, on average, six points for all sensory parameters evaluated. Commercial juice received, on average, seven points. The proximal composition on a dry matter of GPF beverage was 10.1% protein, 11.1% lipids and 76.3% carbohydrate. The phenolic content ranged from 46.5 to

95.8 and from 2.00 to 4.80 µg/mg GAE (gallic acid equivalents) in aqueous, ethanol and acetone extracts of GPF beverage and commercial juice, respectively. Extracts of GPF beverage showed significantly higher amounts of phenolics than the commercial juice. GPF beverage extracts were significantly better than commercial juice extracts in every antioxidant activity analysis performed. Commercial juice and GPF beverage intake has not altered the amounts of total cholesterol, LDL-C, HDL-C, VLDL-C and triglycerides during the study. Values of C-reactive protein, IL-6, TNF- α and MCP-1 showed no significant difference before and after the intervention with commercial juice and GPF beverage. There was no significant change in the lag phase of plasma oxidation. The plasma antioxidant capacity differed significantly only in the ORAC assay for intervention with the GPF beverage. SOD, CAT and GSH-Px activities did not differ significantly in both groups. The consumption of GPF beverage reduced oxidative DNA damage in lymphocytes. The average food consumption was statistically similar in all three periods. **Conclusions:** The GPF beverage was sensory accepted and presented significant antioxidant capacity in *in vitro* assays. The amount of 300 mL/day of this drink for 14 days significantly increased plasma antioxidant capacity, measured by the ORAC assay, and protected from oxidative damage the DNA of lymphocytes of healthy women. Other parameters of redox balance and biomarkers of the risk for cardiovascular disease were not affected.

Word-key: grape, by-product, antioxidants, lipid peroxidation, inflammatory biomarkers, cardiovascular disease.

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	14
3 ANTIOXIDANTES	16
4 FENÓLICOS	17
5 UVA.....	18
6 REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE BAGAÇO DE SUCO DE UVA	36
1 INTRODUÇÃO	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 GERAL	37
2.2 ESPECÍFICOS:.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 MATÉRIA-PRIMA	38
3.1.1 Análise microbiológica	39
3.2 BEBIDA À BASE DE FARINHA DE BAGAÇO DE SUCO DE UVA (FBSU).....	39
3.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL	39
3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	40
3.4.1 Potencial hidrogeniônico	40
3.4.2 Teor de sólidos solúveis.....	40
3.4.3 Cor	40
3.5 ANÁLISE SENSORIAL	40
3.6 OBTENÇÃO DE EXTRATOS	41
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	41
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
3.8.1 Teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical (ORAC).....	42
3.8.2 Capacidade antioxidante total (TAS).....	43
3.8.3 Capacidade de sequestrar o radical DPPH.....	43
3.8.4 Sistema β -caroteno/ácido linoléico	44
3.9 Análise dos dados	45
4 RESULTADOS	45
4.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA MATÉRIA-PRIMA	45
4.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL	46
4.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	47
4.3.4 Avaliação do pH e cor após armazenamento.....	47
4.4 ANÁLISE SENSORIAL	48
4.5 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	50
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	51
4.6.1 Teste ORAC.....	51
4.6.2 Capacidade antioxidante total do plasma (TAS)	52
4.6.3 Capacidade de sequestrar o radical DPPH.....	52
4.6.4 Sistema β -caroteno/ácido linoléico	53
5 DISCUSSÃO	54

6 CONCLUSÃO	59
7 REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE BEBIDA À BASE DE SUBPRODUTO DE SUCO DE UVA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES DE RISCO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM MULHERES SAUDÁVEIS	63
1 INTRODUÇÃO	63
2 OBJETIVOS	64
2.1 GERAL	64
2.2 ESPECÍFICOS	64
3 MÉTODOS	65
3.1 DELINEAMENTO E PROTOCOLO DO ESTUDO	65
3.2 BEBIDA À BASE DE SUBPRODUTO DO SUCO DE UVA	66
3.3 OBTENÇÃO DO SANGUE, SORO, PLASMA, ERITRÓCITOS E LDL .	67
3.4 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO	68
3.5 MARCADORES INFLAMATÓRIOS	69
3.5.1 Proteína C reativa	69
3.5.2 Citocinas	69
3.6 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	70
3.7 ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	70
3.7.1 Hemoglobina nos eritrócitos	70
3.7.2 Superóxido dismutase (SOD)	71
3.7.3 Glutathione peroxidase (GSH-Px)	71
3.7.4 Catalase (CAT)	72
3.8 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA	72
3.8.1 Capacidade antioxidante total do plasma (TAS)	72
3.8.2 Teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical (ORAC)	73
3.9 ENSAIO COMETA	73
3.10 ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR	75
3.11 - ANÁLISE DOS DADOS	75
4 RESULTADOS	76
4.1 PERFIL LIPÍDICO	76
4.2 – MARCADORES INFLAMATÓRIOS	77
4.3 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	77
4.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	78
4.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA	78
4.6 ENSAIO COMETA	79
4.7 CONSUMO ALIMENTAR	80
5 DISCUSSÃO	80
6 CONCLUSÃO	86
7 REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	91
ANEXO 1	92
ANEXO 2	94
ANEXO 3	95
ANEXO 4	97
ANEXO 5	99

APRESENTAÇÃO

Esta tese compõe-se de três capítulos. O primeiro apresenta uma revisão bibliográfica sobre a uva, reunindo os trabalhos mais relevantes e recentes acerca do seu potencial antioxidante e outros benefícios à saúde humana, uma breve revisão a respeito do estresse oxidativo e doenças cardiovasculares, e sobre compostos fenólicos. O segundo tratou do desenvolvimento de uma bebida à base de bagaço de suco de uva, incluindo os seguintes tópicos: Introdução, Objetivos, Material e métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências. O terceiro seguiu o mesmo padrão do segundo e abordou os efeitos da bebida de bagaço de suco de uva sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis. Documentos e outras informações relevantes estão apresentados em Anexos.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO

Mais de 33 milhões de pessoas morrem por ano devido a doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), tais como doenças cardiovasculares (DCV), diabetes e cânceres. Esse quadro leva a uma demanda significativamente crescente nos sistemas nacionais de saúde. Grande parte dessa demanda poderia ser evitada pela prevenção aos fatores de risco das DCNT (WHO, 2005).

DCVs são problemas dos mais importantes de saúde pública do mundo moderno, responsável por grande parte da morbidade e mortalidade. A redução do nível de atividade física da população somado à imprudências dietéticas tem contribuído para desenvolvimento das DCV (KAR et al., 2006). Por outro lado, a alta ingestão de frutas e vegetais tem sido relacionada à baixa incidência de muitas doenças, como as DCV e certos cânceres (KRIS-ETHERTON et al., 2002; VOGEL, 2002; ALBERS et al., 2004; WHO, 2005).

Neste contexto, as uvas (*Vitis* sp) e seus produtos, como o suco e o vinho, têm sido objeto de muitos estudos científicos. Os polifenóis presentes nas uvas e suas preparações estão associados à proteção antioxidante (STEIN et al., 1999; O'BYRNE et al., 2002), prevenção de agregação plaquetária (STRUCK et al., 1994; FREEDMAN et al., 2001), redução da formação de trombos (DEMROW et al., 1995) e da concentração de biomarcadores de inflamação (ESTRUCH et al., 2004; CASTILLA et al., 2006). Em modelos animais, os compostos fenólicos da uva também reduziram lipídios no plasma, aumentaram atividade de enzimas antioxidantes (ISHIMOTO, 2007) e previniram oxidação da LDL, dano oxidativo ao DNA e doenças coronarianas (FRANKEL et al., 1998; OSMAN et al., 1998; SINGLETARY et al., 2003).

Na produção de vinhos e suco de uva são geradas grandes quantidades de bagaço residual, o qual possui alto teor de antioxidantes e de fibras. Por outro lado, esse resíduo é prejudicial ao meio ambiente. Considerando-se a expressiva produção de vinhos e sucos de uva, bem como o alto teor de polifenóis e o baixo

custo do bagaço residual, pode-se dizer que esses subprodutos estão entre as mais significativas fontes de antioxidantes naturais (DIÁZ et al., 2002; MADEJÓN et al., 2001, 2002; YILMAZ e TOLEDO, 2004).

No Brasil, apesar da crescente produção de vinhos e sucos em escala industrial, há poucos dados sobre o aproveitamento de seus resíduos na forma de antioxidante alimentar ou suplemento nutricional. Assim, justifica-se o desenvolvimento de uma bebida à base de farinha do bagaço proveniente do processamento de suco de uva (FBSU) e a avaliação de seus efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco cardiovascular em mulheres saudáveis.

2 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Na década passada, inúmeras evidências indicaram um denominador comum, as espécies reativas de oxigênio (ERO), no desenvolvimento da maioria das DCV (PAPAHARALAMBUS e GRIENDLING, 2007).

Radicais livres podem ser formados por fontes exógenas, como: tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações; e fontes endógenas (SOARES, 2002). A produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é inerente ao metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica. Quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (FINKEL e HOLBROOK, 2000; SCHAFER e BUETTNER, 2001).

Mudanças no balanço redox de sistemas biológicos podem causar estresse oxidativo, resultante do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante (FINKEL e HOLBROOK, 2000; GROW e ISCHIROPOULOS, 2001; SCHAFER e BUETTNER, 2001). A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da

compartimentalização celular destes processos (GROW e ISCHIROPOULOS, 2001).

A oxidação é um processo fundamental no metabolismo do oxigênio molecular (O_2) utilizado na cadeia respiratória, que ocorre na membrana da mitocôndria para a produção de energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina). Porém, não é todo oxigênio disponível na célula que se converte em energia; uma pequena parte (5%) dá origem a radicais livres, as ERO (HALLIWELL, 1996). A produção de radicais livres é, portanto, uma consequência natural da existência dos seres aeróbicos, que utilizam o oxigênio para oxidar substratos ricos em carbono e hidrogênio, obtendo a energia química e térmica, essenciais para a vida (GUTTERIDGE, 1995).

Os radicais livres estimulam os tecidos a secretarem citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral – $TNF-\alpha$, interleucina- 1β – $IL-1\beta$ e interleucina-6 – $IL-6$), provavelmente através dos macrófagos, estimulando assim a formação das moléculas de adesão (ESPOSITO et al., 2003; BURDGE e CALDER, 2005). Estes radicais produzidos pelos macrófagos e neutrófilos são empregados no combate a bactérias e fungos invasores do organismo (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000).

Marcadores de inflamação circulantes, como PCR (proteína C-reativa), $TNF-\alpha$ e algumas interleucinas ($IL-6$, $IL-8$) são correlacionados com propensão em desenvolver eventos isquêmicos (RIDKER et al., 2002). Fases circulantes dos reagentes inflamatórios podem, não apenas marcar aumento do risco para eventos vasculares, mas em alguns casos contribuir para sua patogênese (LAU et al., 2005). A inflamação tem papel central em todas as fases do processo aterosclerótico (LIBBY et al., 2002). Alta concentração de proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) está implicada no desenvolvimento da aterosclerose (GIEHL et al., 2007) e concentrações elevadas de moléculas de adesão celular são associadas com o risco aumentado de DCV e refletem dano ao endotélio (HWANG et al., 1997).

O excesso dos radicais livres no organismo também leva a importantes alterações em nível molecular que estão associadas a danos às macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA. Esses danos geram alterações teciduais

implicadas em inúmeros processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas no desenvolvimento de muitas doenças (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000).

As reações oxidativas estão ligadas aos mecanismos patofisiológicos primários e secundários das DCNT (BARNHAM et al., 2004; DALLE-DONNE et al., 2006). Autores sugerem que a peroxidação da LDL é um importante fator no desencadeamento da aterosclerose (WALZEM et al., 1995; STEINBERG, 1997), doença multifatorial e complexa, associada ao estresse oxidativo (WALZEM et al., 1995; STEINBERG, 1997). A oxidação da LDL altera sua estrutura permitindo que esta molécula de LDL penetre mais facilmente no espaço subendotelial e seja captada pelos macrófagos, levando a formação de células esponjosas, indicador precoce da lesão aterosclerótica (HAKIMOGLU et al., 2007).

3 ANTIOXIDANTES

O termo antioxidante se refere a qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda ou inibe consideravelmente a oxidação do substrato (THOMAS, 2000). Do ponto de vista biológico, podemos conceituar antioxidantes como substâncias que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALLA, 2000).

Os sistemas naturais de defesa incluem uma gama variada de substâncias que atuam em três diferentes níveis do processo oxidativo: (1) bloqueiam a etapa de iniciação, que impedem a geração de espécies reativas ou sequestram-nas de forma a impedir sua interação com alvos celulares. Ex: enzimas antioxidantes, tocoferóis, bioflavonóides e carotenóides; (2) bloqueiam a etapa de progressão da cadeia radicalar, sequestrando radicais intermediários. Ex: tocoferóis (vitamina E), tocotrienóis, flavonóides e antioxidantes sintéticos; e, finalmente (3) caracterizam-se pelas proteases e fosfolipases responsáveis pelo reparo das

lesões oxidativas ao DNA (ABDALLA, 2000; THOMAS, 2000; VANDENBROUCKE et al., 2001).

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas seguintes enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e, a glutathione peroxidase (GSH-Px) que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator. O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathione (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina e ceruloplasmina (VASCONCELOS, 2007).

Antioxidantes naturais, conhecidos como fitonutrientes ou fitoquímicos, estão aumentando suas participações na nutrição e terapêutica e, dentre eles, destacam-se os flavonóides que são compostos polifenólicos. Estão presentes em folhas, flores, frutas, sementes, castanhas, grãos, especiarias, plantas medicinais e bebidas como vinhos e chá. Os flavonóides possuem propriedades antioxidantes e eliminadoras de radicais livres, e propriedades quelantes que reduzem a ação de metais pró-oxidantes (PIETTA, 2000; GALE, 2001).

A importância dos antioxidantes para a saúde consiste na sua capacidade em inibir ou retardar a formação e ação deletéria de certos compostos oxidantes, provenientes do metabolismo do oxigênio molecular, popularmente conhecidos como radicais livres (ISHIMOTO, 2003).

4 FENÓLICOS

Fenólicos são compostos bioativos largamente distribuídos em vegetais e bebidas (DUTHIE et al., 2003). Alguns, como os taninos, são considerados antinutrientes por formarem complexos com proteínas, amidos e enzimas digestivas, reduzindo a digestibilidade e, portanto, o valor nutricional dos

alimentos (DREOSTI, 2000). Entretanto, estes compostos possuem potencial efeito benéfico para a saúde devido a proteção contra doenças associadas ao estresse oxidativo (HERTOG et al., 1993; MONTILLA et al., 2004; RODRIGO et al., 2005).

Os fenólicos reduzem o estresse oxidativo pela inibição de reações de peroxidação. O aumento de sistemas antioxidantes, modulação enzimática e quelação de metais são atribuídos a seus flavonóides (FUHRMAN e AVIRAM, 2001; BUTERA et al., 2002; EDENHARDER e GRUNHAGE, 2003). Os flavonóides possuem capacidade de inibir enzimas como as ciclooxidasas e proteínas quinases envolvidas na proliferação e apoptose celular. Eles podem modificar a síntese de eicosanóides com implicações na inflamação e doença vascular. Seus efeitos sobre a agregação plaquetária, oxidação da LDL e vasodilatação sugerem poder de interromper a fisiopatologia da formação da placa aterosclerótica. Estes resultados mostram benéficos à saúde (FORMICA e REGELSON, 1995; YANG et al., 2009).

5 UVA

No cultivo mundial de frutas, a uva é uma das mais importantes, com mais de 67 milhões de toneladas produzidas anualmente (FAO, 2007). As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos dentre as frutas e vegetais (MAXCHEIX et al., 1990).

Os compostos fenólicos das uvas podem ser classificados em flavonóides e não-flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte os flavanóis (catequina, epicatequina e epigallocatequina), flavonóis (caempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas, e ao segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos, hidroxiben-zóicos e hidroxicinâmicos (CABRITA et al., 2003). Além destes compostos, pode-se encontrar também o resveratrol, polifenol pertencente à classe dos estilbenos (MUÑOZ-ESPADA, 2004), o qual é encontrado principalmente em produtos de uvas tintas (SOLEAS et al., 1997; WANG et al., 2002; FULEKI e SILVA, 2003).

As antocianinas são flavonóides responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e as tonalidades de vermelho, em flores e frutos. Em uvas tintas, as antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos e contribuem para os atributos sensoriais e de coloração do vinho tinto (MUÑOZ-ESPADA, 2004). As catequinas e epicatequinas, presentes principalmente em sementes de uvas, são os principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos e sucos. Quercetina, caempferol e miricetina, embora presentes em menor quantidade são importantes no desenvolvimento da coloração do vinho, atuando como co-pigmentos junto às antocianinas. Os ácidos fenólicos, usualmente encontrados em baixas concentrações, representam um dos principais compostos em uvas brancas, influenciando o aroma e gosto dos vinhos. Além das características sensoriais, todos esses compostos contribuem para aumentar as propriedades benéficas dessas bebidas (ABE et al., 2007).

Estudos observacionais e de intervenção sugerem associação benéfica entre o consumo moderado de bebidas alcóolicas e sistema inflamatório (IMHOF et al., 2001; SIERKSMA et al., 2002). Dados epidemiológicos indicam que moderada ingestão de vinho tinto está associada à redução de DCV e alguns efeitos cardioprotetores, enquanto a alta ingestão é associada a aumento do risco das DCV e câncer (Di CASTELNUOVO et al., 2002; KARLSENA et al., 2007).

O reconhecido “paradoxo francês” atribui a taxa relativamente baixa de mortalidade por DCV em países do Mediterrâneo, entre outros fatores, ao consumo regular de vinho tinto, um produto rico em flavonóides (RENAUD E LORGERIL, 1992). Entretanto, é necessário determinar se os efeitos benéficos do vinho tinto provêm dos flavonóides, do álcool ou de ambos. Após a ingestão, polifenóis são detectados no plasma tanto na forma solúvel quanto associado a lipoproteínas (FUHRMAN et al., 1995; HAYEK et al., 1997; NIGDIKAR et al., 1998).

Administração oral de flavonóides da uva exerce proteção antioxidante (STEIN et al., 1999; O’BYRNE et al., 2002), inibição da função plaquetária (STRUCK et al., 1994; FREEDMAN et al., 2001), redução da formação de trombos (DEMROW et al., 1995) e da concentração de biomarcadores

inflamatórios (ESTRUCH et al., 2004); efeito vasodilatador (ZENEBE et al., 2003) e inibição da adesão de monócitos no endotélio (CARLUCCIO et al., 2003; BADÍA et al., 2004).

CASTILLA et al. (2006) suplementaram pacientes de hemodiálise e pessoas saudáveis com 200 mL por dia de suco de uva tinta concentrado (0,64g/100mL de polifenólicos totais, usando ácido gálico como calibrador). Neste trabalho, observaram que depois de quatorze dias de suplementação com o suco, o perfil de lipoproteínas melhorou tanto nos pacientes quanto no grupo saudável, diminuindo a concentração plasmática de LDL-c e aumentando HDL-c e reduzindo a concentração plasmática de LDL oxidada. Este estudo concluiu que a suplementação dietética com o suco de uva concentrado exerce efeito hipolipidêmico, antioxidante e antiinflamatório em pacientes com doença renal avançada e em indivíduos saudáveis.

GIEHL et al. (2007), após revisão da eficácia dos flavonóides da uva na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose, concluíram que os compostos fenólicos do vinho tinto exercem forte ação antioxidante em humanos e animais, sendo capazes de reduzir a oxidação da LDL-c, diminuir vasoconstrição arterial, melhorar função endotelial e que o consumo desta bebida possui associação inversa com o risco de DCV.

Os mesmos autores verificaram que o suco de uva tem mais flavonóides que o vinho tinto, aumentando significativamente os flavonóides do plasma. Entretanto, houveram controvérsias quanto ao seu efeito antioxidante, pois mostrou-se ineficaz em alguns estudos, não reduzindo oxidação da LDL. Contudo, outros estudos mostraram que o suco de uva foi capaz de inibir a oxidação da LDL e o desenvolvimento de placa lipídica, diminuir agregação plaquetária, melhorar função endotelial, vasodilatação, reduzir colesterol total e citocinas inflamatórias, modificações favoráveis para prevenir ou evitar o desenvolvimento da placa aterosclerótica (GIEHL et al., 2007). Os principais resultados de alguns estudos de intervenção com uva e seus produtos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Síntese de pesquisas de efeitos da uva e seus produtos em humanos

Desenho do estudo	Principais resultados do estudo	Ano	Referência
Suplementação com vinho tinto, vinho branco, polifenóis de vinho tinto, polifenóis de vinho tinto dissolvidos em vinho branco ou bebida alcoólica controle a grupos de 6-9 homens saudáveis por 2 semanas	Aumento de polifenóis no plasma, redução da peroxidação lipídica, aumento do <i>lag time</i>	1998	NIGDIKAR et al.
Suplementação com 113 mL de água, vinho tinto sem álcool e branco em intervalos de 1 semana em 10 voluntários saudáveis	Aumento da capacidade antioxidante e polifenóis no plasma	1998	SERAFINI et al.
Suplementação com suco de uva tinto por 14 dias em 15 adultos com doença arterial coronariana	Aumento da função endotelial, redução da susceptibilidade a oxidação de LDL	1999	STEIN et al.
Estudo randomizado <i>crossover</i> . Dez voluntários saudáveis ingeriram suco de uva tinto ou suco de laranja por 7 – 10 dias	Inibição da agregação plaquetária em humanos	2000	KEEVIL et al.
Estudo randomizado <i>crossover</i> . Quinze indivíduos consumiram extrato de casca de uva e dieta pobre em flavonóides ou somente a dieta por 7 dias	Aumento da atividade da glutathione redutase e glutathione peroxidase. Não alterou catalase, superóxido dismutase e oxidação lipoprotéica	2000	YOUNG et al.

continua

continuação

Desenho do estudo	Principais resultados do estudo	Ano	Referência
Suplementação com extrato de semente de uva em 9 indivíduos saudáveis e 8 hipercolesterolêmicos	Melhora do perfil lipídico e capacidade antioxidante do plasma em sujeitos hipercolesterolêmicos	2001	VINSON et al.
Voluntários saudáveis (n=8) consumiram refeição teste rica em lipídios oxidados e oxidável com e sem 300 mg de extrato de semente de uva	Redução do estresse oxidativo pós-prandial, aumento do nível de antioxidantes em fumantes	2002	NATELLA et al.
Indivíduos foram randomizados para receber 400 UI RRR-tocoferol /dia (n = 17) ou 10 mL de suco de uva concentrado (n = 15) durante 2 semanas	Aumento de fenólicos no plasma, triglicérides, ORAC, <i>lag time</i> e diminuiu oxidação da LDL	2002	O`BYRNE et al.
Estudo randomizado, duplo-cego, com 24 homens saudáveis fumantes. Receberam extrato de uva ou placebo durante 4 semanas	Não influenciou colesterol total, LDL, HDL e triglicérides. Aumentou <i>lag time</i> e reduziu TBARs	2003	VIGNA et al.
Estudo randomizado, <i>crossover</i> , duplo-cego com 20 indivíduos portadores de doença coronariana ingeriram placebo ou suco de uva tinta durante 14 dias, intercalados por 2 semanas de <i>washout</i>	Não alterou agregação plaquetária, colesterol total, LDL e triglicérides	2004	ALBERS et al.
Estudo randomizado, <i>crossover</i> , duplo-cego com 40 homens saudáveis ingerindo 30 g de etanol/dia de vinho ou gim por 28 dias	Redução de IL-1, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 e proteína C-reativa	2004	ESTRUCH et al.

continua

continuação

Desenho do estudo	Principais resultados do estudo	Ano	Referência
Suplementação com suco de uva concentrado em 26 pacientes submetidos a hemodiálise e 15 indivíduos saudáveis durante 14 dias	Aumento da capacidade antioxidante do plasma, melhora do perfil lipídico, redução de biomarcadores inflamatórios no plasma e da LDL oxidada	2006	CASTILLA et al.
Suplementação com 300 mL de vinho tinto em 10 indivíduos saudáveis e 300 mL de vinho branco em outros dez	Aumento de polifenóis no plasma, redução de PGF-2 α -III, não alterou isoprostanos na urina e perfil lipídico	2006	PIGNATELLI et al.
Estudo com 88 indivíduos saudáveis separados em grupo controle e grupo consumindo 150 mL de vinho tinto/dia durante 3 semanas	Não alterou 33 biomarmadores inflamatórios	2007	KARLSEN et al.
Estudo randomizado, controlado com 21 adultos normocolesterolêmicos e 13 hipercolesterolêmicos suplementados por 16 semanas com fibra antioxidante da uva	Diminuição de colesterol total, LDL e triglicérides nos hipercolesterolêmicos	2008	PÉREZ-JIMÉNEZ et al.
Estudo randomizado, duplo-cego com 31 homens saudáveis suplementados com uma cápsula contendo polifenóis de uvas viníferas ou de semente de uva em 2 períodos de 2 semanas, intercalados por uma semana de <i>washout</i>	Não afetou função vascular	2010	MIERLO et al.

LDL – Lipoproteína de baixa densidade; HDL – Lipoproteína de alta densidade; GSH – Glutathione redutase; GSH-Px – Glutathione peroxidase; CAT – Catalase; SOD – Superóxido dismutase; ORAC – Capacidade de absorvência de oxigênio radical; IL-1 – Interleucina-1, MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos; VCAM-1 – Molécula de adesão vascular-I, ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-I; PCR – Proteína C reativa; PGF – Prostaglandina

O crescente interesse nos supostos benefícios do vinho na proteção contra DCV contrasta com a limitação do consumo de álcool, estimulando investigações do potencial benéfico de produtos de uvas tintas (KRIS-ETHERTON et al., 2002; VOGEL, 2002; ALBERS et al., 2004). Paralelamente, um dos maiores problemas relatados na indústria de vinificação e destilados é a geração de uma grande quantidade de resíduos em um curto período de tempo do ano (cerca de três meses) (KEPOS, 2000; SEÓANEZ et al., 2000; FAO, 2006), bem como algumas características poluentes desses resíduos: baixo pH, alto teor de fitotóxicos e substâncias fenólicas antibacterianas, residuais da degradação biológica (SEÑER e VIDAL, 2001).

O processo de vinificação gera produto residual (bagaço) após a etapa da fermentação. Estima-se que este subproduto, constituído basicamente de cascas e sementes, corresponda de 20 a 50% do peso das uvas (MAZZA, 1995; GÓMEZ-PLAZA et al., 2006; LUQUE-RODRÍGUEZ et al., 2007). No Brasil, 40% das uvas processadas transformam-se em resíduo (EMBRAPA, 2007). A fim de minimizar o impacto ambiental e reciclar esses resíduos, várias alternativas tem sido propostas, entre elas, o uso de bagaço e vinhoto como ingredientes na produção de alimentos (VACCARINO et al., 1993; LO CURTO e TRIPODO, 2001), extração e recuperação de compostos fenólicos (LOULI et al., 2004), produção de óleo de semente da uva (MOLERO et al., 1995a,b) e alimentação de animais (EMBRAPA, 2007).

Outra alternativa para reciclagem desses resíduos pode ser seu uso como fertilizante orgânico. Muitos autores têm relatado efeitos positivos no crescimento das plantas (MARIOTTI et al., 2000; MASONI et al., 2000; BARAN et al., 2001). Porém, outros observaram efeitos negativos (MASONI et al., 2000; BUSTAMANTE et al., 2004; FLAVEL et al., 2005). Contudo, ainda não há dados suficientes para avaliar a real aplicabilidade desses resíduos de vinificação e destilação na agricultura. Por isso, antes de progredir no uso seguro desses resíduos, é necessário caracterizá-los (BUSTAMANTE et al., 2008).

O uso potencial de resíduos da vinificação e destilação como componentes de diferentes substâncias depende do valor comercial dos produtos obtidos. Pesquisadores têm focado especialmente na composição desses resíduos

(bagaço) como fonte agregadora de valor (WALLACH et al., 1992; MADEJÓN et al., 2001, 2002; DIÁZ et al., 2002).

Sementes e cascas de uva são boas fontes de fitoquímicos, tais como ácido gálico, catequinas e epicatequinas. Apesar da possibilidade da transferência dos polifenóis da casca da uva para o vinho durante a vinificação e da possibilidade de perda desses compostos por oxidação durante o processo de secagem, os subprodutos das sementes e cascas ainda são boas fontes de compostos antioxidantes e são adequados para produção de suplementos antioxidantes dietéticos (YILMAZ e TOLEDO, 2004).

Os constituintes das cascas e sementes da uva, flavonóides (catequinas, epicatequinas, procianidinas e antocianinas), ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico) e estilbenos (resveratrol e piceid), possuem atividade funcional. Extrato de procianidina da semente tem atividade antioxidante *in vivo* (SATO et al., 2001) e pode ser importante como a vitamina E na prevenção de danos oxidativos em tecidos (TEBIB et al., 1997) por redução da oxidação lipídica (BOUHAMIDI et al., 1998) e/ou inibição da produção de radicais livres (BAGCHI et al., 1998).

Constituintes bioativos de plantas, como os polifenóis que estão largamente presentes em subprodutos da vinificação, vem sendo muito estudados devido ao seu potencial benefício à saúde. Neste sentido, muitos estudos estão direcionados a estabelecer condições ótimas para extração desses polifenóis (ALONSO et al., 2002). MAKRIS et al. (2007) verificaram que a extração dos polifenóis das sementes residuais da vinificação foi mais eficiente com solvente 57% água em etanol e encontraram quantidades significativas de polifenóis antioxidantes nas sementes e, relativamente alta de umidade e baixo teor de fenólicos na casca. No extrato etanólico do bagaço de uva tinta (*Vitis vinífera*, variedade “Negro Amaro”, safra 1999), NEGRO et al (2003) identificaram, em % do resíduo seco, 4,2% de fenólicos totais; 4% de flavonóides; 1% de antocianinas; 2,2% de taninos condensados e 1,3% proantocianidinas. O teor de polifenóis é maior nas sementes (8,5% do resíduo seco) do que nas cascas de uvas (3,3% do resíduo seco) (NEGRO et al, 2003).

Os antioxidantes naturais provenientes de resíduos podem ser usados para aumentar a vida de prateleira dos alimentos por prevenir peroxidação lipídica e proteger dos danos oxidativos (MOURE et al., 2001). Muitos subprodutos e resíduos gerados na produção do vinho, como cascas e sementes, contém polifenóis com potencial aplicação como antioxidante alimentar e agente preventivo contra câncer e outras doenças. Estes produtos podem ser usados como componentes na preparação de novos produtos com propriedades antioxidantes (TORRES et al., 2001; 2002; GOÑI et al., 2005; WANG et al., 2010).

Finalmente, há forte evidência epidemiológica da associação da redução do risco de DCV e o consumo de uvas e outros alimentos ricos em compostos fenólicos. Uma questão importante ainda não esclarecida é como chegar a uma recomendação dietética específica para esses compostos. Diversos fatores complicam a formulação de uma recomendação, como por exemplo, a ampla distribuição e diversidade de polifenóis nos alimentos, variação da biodisponibilidade, entre outros. Além disso, permanece incerto quais componentes dos alimentos ricos em polifenóis que realmente conferem benefício à saúde. Entretanto, é consenso que uma dieta rica em frutas e vegetais, incluindo as uvas, é uma estratégia adequada para reduzir o risco de DCV (DOHADWALA e VITA, 2009).

6 REFERÊNCIAS

1. Abdalla, D.S.P. Estresse oxidativo e alimentação. In: Tirapegui J (ed) *Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.179-200.
2. 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.
3. Albers AR, Varghese S, Vitseva O, Vita JA, Freedman JE. The Antiinflammatory Effects of Purple Grape Juice Consumption in Subjects with Stable Coronary Artery Disease *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2004; 24:179-180.
4. Alonso AM, Guillen DA, Barroso CG, Puertas B, Gracia A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem* 2002; 50:5832–5836.
5. Badía E, Sacanella E, Fernández-Sola J, et al. Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:225–30.
6. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmac* 1998; 30(5):771–776.
7. Baran A, Cayci G, Kutuk C, Hartmann R. Composted grape marc as growing medium for hypostases (*Hypostases phyllostagya*). *Biores Technol* 2001; 78:103–106.
8. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress [Review]. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:205– 14.
9. Bouhamidi R, Prevost V, Nouvelot A. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *Life Sci* 1998; 321:31–38.
10. Burdge GC, Calder PC. Horizons in nutritional science plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? *Br J Nutr* 2005; 93:3-9.
11. Bustamante MA, Moral R, Paredes C, Pérez-Espinosa A, Moreno-Caselles J, Pérez-Murcia MD. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management* 2008; 28:372–380.
12. Bustamante MA, Pérez-Murcia MD, Paredes C, Moral R, Pérez-Espinosa A, Moreno-Caselles J. 2004. Short-term carbon and nitrogen mineralisation in soil amended with winery and distillery organic wastes. In: 11th International Conference of the FAO ESCORENA Network on Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture (RAMIRAN), Murcia.

13. Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F et al. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia Picus inca*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem* 2002; 50:6895–901.
14. Cabrita MJ, Ricardo-Da-Silva J, Laureano O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: I SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA. Anais...Ensenada, México, 2003.
15. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 622–629.
16. Castilla P, Echarrri R, Dávalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, Lucas MF, Gómez-Coronado D, Ortuñ J, Lasunción M.A. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:252–62.
17. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease *Clinical Chem* 2006; 52:4 601–623.
18. Demrow HS, Slane P, Folts J. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary artery. *Circ* 1995; 91:1182–8.
19. Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circ* 2002; 105(24):2836–44.
20. Diaz MJ, Madejon E, Lopez F, Lopez R, Cabrera F. Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. *Process Biochemist* 2002; 37:1143–1150.
21. Dohadwala MM, Vita JA. Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2009;139:S1788–93.
22. Dreosti IE. Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa, and Wine. *Nutr.* 2000; 16:692-694.
23. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc* 2003; 62:599–603.
24. Edenharder R, Grunhage D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by ter-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* 2003; 540:1–18.
25. EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [homepage na internet] [acesso em 10/11/2010] Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br/embrapa/imprensa/noticias/2007/junho/3a-semana/noticia.2007-06-18.2890923758>
26. Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M. et al. Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:1135-40.

27. Estruch R, Sacanella E, Badía E. et al. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosc* 2004; 175:117–23.
28. FAO - Food and Agriculture Organisation, 2006. [homepage na internet] FAOSTAT database. [acesso em 13/01/2010] Disponível em: <http://apps.fao.org>.
29. FAO - Food and Agriculture Organisation, 2007. [homepage na internet] FAOSTAT database. Faostat agriculture data – croops and crops processed – grape an wine.[acesso em 20/10/2009] Disponível em: <http://apps.fao.org>.
30. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nat* 2000; 408(6809):239–247.
31. Flavel TC, Murphy DV, Lalor BM, Fillery IRP. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biol and Biochem* 2005; 37:1397–1400.
32. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995; 33:1061–80.
33. Frankel EN, Bosanek CA, Meyer AS, Silliman K, Kirk LL. Commercial grape Juices inhibit the in vitro oxidation of human lowdensity lipoproteins. *J Agric Food Chem* 1998; 46:834–838.
34. Freedman JE, Parker C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circ.* 2001; 103:2792–2798.
35. Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:41–8.
36. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:549 –54.
37. Fuleki T, Silva J.M.R. Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *J Agric Food Chem* 2003; 51:640–646.
38. Gale CR. Dietary antioxidants and dementia. *Int Psychogeriatr* 2001; 13(3): 259-62.
39. Giehl MR, Bosco SMD, Laflor CM, Weber B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. *Scientia Medica* 2007; 17(3): 145-55.
40. Gómez-Plaza E, Miñano A, López-Roca JM. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chem.* 2006; 97(1): 87-94.
41. Goñi I, Martín N, Saura-Calixto F. In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. *Food Chem* 2005; 90:281-6.
42. Grow AJ, Ischiropoulos HJ. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J Cell Physiol* 2001; 187: 277–282.

43. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; (41/12):1819-1828.
44. Hakimoglu F, Kızıl G, Kanayb Z, Kızıl M, Isı H. The effect of ethanol extract of *Hypericum lysimachioides* on lipid profile in hypercholesterolemic rabbits and its in vitro antioxidant activity. *Atherosc* 2007; 192: 113–122
45. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
46. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16:33-50.
47. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews* 1994; 2(8): 253-265.
48. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J. et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2744 –52.
49. Hertog MG, Feskens FJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342:1007–11.
50. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AMJr.; et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circ* 1997; 16:4219-25.
51. Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001; 357(9258):763–7.
52. Ishimoto EY. *Atividade antioxidante in vitro em vinhos e sucos de uva*. [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.
53. Ishimoto EY. *Efeito hipolipemiante de subprodutos da uva em hamsters*. [Tese de doutorado] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.
54. Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract* 2006; 60(11):1484–1492.
55. Karlsen A, Retterstol L, Laake P, Kjolsrud-Bohn S, Sandvik L, Blomhoff R. Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidant status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. *European J Clin Nutr Metabolism*. 2007; 2:127-133.
56. Karlseña A, Retterstølb L, Laakec P, Kjølrsrud-Bøhna S, Sandvikd L, Blomhoffa R. Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidant status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. *J Clin Nut Metabol* 2007; 2: 127–133.
57. Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits platelet aggregation. *J Nutr* 2000; 130: 53–6.
58. KEPOS, 2000. *Impactos ambientales en la bodega (Environmental impacts in the winery)*. Fundacion Caja Rioja, Logrono, p. 24.

59. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 2002; 113(9B):71–88.
60. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 2031-41.
61. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation an atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
62. Lo Curto RB, Tripodo MM. Yeast production from virgin grape marc. *Biores Technol* 2001; 78: 5–9.
63. Louli V, Ragoussis N, Magoulas K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Biores Technol* 2004; 92:201–208.
64. Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD, Perez-Juan P. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues *Biores Technol* 98 (2007) 2705–2713
65. Madejon E, Diaz MJ, Lopez R, Cabrera F. Co-composting of sugarbeet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used. *Biores Technol* 2001; 76:275–278.
66. Madejon E, Diaz MJ, Lopez R, Cabrera F. New approaches to establish optimum moisture content for compostable materials. *Biores Technol* 2002; 85:73–78.
67. Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos N.K. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Biores Technol* 2007; 98:2963–2967.
68. Mariotti M, Masoni A, Ercoli L. Distribuzione dei fanghi di cantina alla soia. Nota I. Accrescimento epigeo ed ipogeo (Distribution of winery sludge in soy). *Riv Agronomia* 2000; 34:227–233.
69. Masoni A, Mariotti M, Ercoli L. Distribuzione dei fanghi di cantina al mais. Produzione granellare, assorbimento e lisciviazione dell'azoto e del fosforo (Distribution of winery sludge in maize. Production, absorption and leaching of nitrogen and phosphorus). *Riv Agronomia* 2000; 34:234–245.
70. Maxcheix JJ, Fleuriet A, Billot J. The main phenolics of fruits. In *Fruit Phenolics*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; p.1-98.
71. Mazza, G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1995; 35(4):341-371.
72. Molero A, Pereyra C, Martinez E. Caracterizacio´n del aceite de semilla de uva extraído con dióxido de carbono supercrítico (Characterisation of grape seed oil extracted with supercritical carbon dioxide). *Grasas y Aceites* 1995a; 46:29–34.
73. Molero A, Pereyra C, Martinez E. Optimización del proceso de extraccion del aceite de semilla de uva con dióxido de carbono liquido y supercrítico (Optimisation of the extraction process of grape seed oil with liquid and supercritical carbon dioxide). *Alimentacion, Equipos y Tecnol* 1995b; 3:35–40.

74. Montilla P, Barcos M, Munoz MC, Munoz-Castaneda JR, Bujalance I, Tunes I. Protective effect of Montilla-Moriles appellation red wine on oxidative stress induced by streptozotocin in the rats. *J Nutr Biochem* 2004; 15:688–93.
75. Moure AS, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Nuñez MJ, Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72:145-171.
76. Muñoz-Espada AC et al. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and wines. *J Agric Food Chem* 2004; 52:6779-6786.
77. Natella F, Belelli F, Gentili V, Ursini F, Scaccini. Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *J Agric Food Chem* 2002; 50:7720-7725.
78. Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Biores Technol* 2003; 87:41-44.
79. Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:258–65.
80. O’Byrne DJ, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:1367–74.
81. Osman HE, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Nutr* 1998; 128:2307–2312.
82. Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic Mechanisms of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17:48–54.
83. Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio E, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutr*. 2008; 24:646-53.
84. Pieta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-42.
85. Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germano G, Fimognari F, Di Santo S, Lenti L, Violi F. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine *Atheroscler* 2006; 188: 77–83.
86. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339:1523– 6.
87. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *New Engl J Med* 2002; 347(20): 1557-65.
88. Rodrigo R, Castillo R, Carrasco R, Huerta P, Moreno M. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. *Life Sci* 2005; 76:889–900.
89. Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(6):729–737.

90. Schafer FQ, Buettner GR. Redox state of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1191-1212.
91. Señor AR, Vidal AP. 2001. Oportunidades de valorización de los residuos de la industria vinícola (Valorisation opportunities of the residues from the winery industry). I Encuentro Internacional de Gestión de residuos orgánicos en el ámbito rural mediterráneo. Catedra Zurich de Medio Ambiente de la Universidad de Navarra.
92. Seoanez M, Bellas E, Ladaira P, Seoanez P. 2000. Tratado de reciclado y recuperación de productos de los residuos (Treatise of recycling and recover of products from residues). Mundi-Prensa, Madrid, p. 605.
93. Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr.* 1998; 128:1003-1007.
94. Sierksma A, Van der Gaag MS, Kluft C, Hendriks H.F. Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(11):1130–6.
95. Singletary KW, Stansbury MJ, Giusti M, Van Breemen RB, Wallig M, Rimando A. Inhibition of rat tumorigenesis by concord grape juice constituents. *J Agric Food Chem* 2003; 5:7280–7286.
96. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002; 15(1):71-81.
97. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 1997; 30:91–113.
98. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts J.D. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100:1050 –5.
99. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circ* 1999; 100:1050 –5.
100. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272:20963–6.
101. Struck M, Watkins T, Tomeo A, Halley J, Bierenbaum M. Effect of red and white wine on serum lipids, platelet aggregation, oxidation products and antioxidants: a preliminary report. *Nutr Res* 1994; 14:1811–9.
102. Tebib K, Rouanet JM.; Besancon, P. Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin E-deficient diet. *Food Chem* 1997; 59(1):135–141.
103. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrit* 2000; 16(7/8):16-18.
104. Torres JL, Bobet R. New flavanol-derivatives from grape (*Vitis Vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *J Agric Food Chem* 2001; 49:4627-4634.

105. Torres JL, Lozano C, Julia L, Sanchez FJ, Anglada J, Centelles JJ, Cascante M. Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties. *Bioorg Med Chem* 2002; 10:2497-2509.
106. Vaccarino C, Tripodo MM, Lo Curto RB, Cimino G. The effects of NaOH treatments of grape-marc, vinasse and wheat-straw mixtures on their degradability in vitro. *Biores Technol* 1993; 44:197-202.
107. Van Mierlo LAJ, Zock PL, Van der Knaap HDM, Draijer R. Grape polyphenols do not affect vascular function in healthy men. *J Nutr.* 2010; doi:10.3945/jn.110.125518.
108. Vandenbroucke ID, Vericel E, Janiel C, Carreras M, Lecomte, M., Lagarde, M. Dual regulation of glutathione peroxidase by docosa-hexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. *Free Rad Biol Med* 2001; 30: 895-904.
109. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007; 30(5):1323-1338.
110. Vigna GB, Contantini F, Aldini G, Carini M, Catapano A, Schena F, Tangerini A, Zanca R, Bombardelli E, Morazzoni P, Mezzetti A, Fellin R, Facino RM. Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. *Metabolism.* 2003; 52(10):1250-57.
111. Vinson J, Proch J, Bose P. MegaNatural((R)) gold grapeseed extract: in vitro antioxidant and in vivo human supplementation studies. *J Med Food.* 2001; 4: 17-26.
112. Vogel RA. Alcohol, heart disease, and mortality: a review. *Rev Cardiovasc Med.* 2002; 3:7-13.
113. Wallach R, Da Silva FF, Chen Y. Unsaturated hydraulic characteristics of composted agricultural wastes, tuff, and their mixtures. *Soil Scien.* 1992; 153:434-441.
114. Walzem RL, Watkins S, Frankel EN, Hansen RJ, German JB. Older plasma lipoproteins are more susceptible to oxidation: a linking mechanism for the lipid and oxidation theories of atherosclerotic cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci: Appl Biol Sci.* 1995;92: 7460-4.
115. Wang X, Tong H, Chen F, Gangemi JD. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. *Food Chem.* 2010; 123:1156-1162
116. Wang Y, Catana F, Yang Y, Roderick R, Van Breemen RB. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice and in wine. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:431-435.
117. Wang, X, Tong H, Chen F, Gangemi J. D. Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract *Food Chem.* 123 (2010) 1156-1162
118. World Health Organization - WHO 2005 [Homepage na internet] Surveillance of chronic disease: risk factors: country-level data and comparable estimates. [acesso em 03/11/2010] Disponível em: <https://apps.who.int/infobase/Publicfiles/SuRF2.pdf>

119. Yang J, Martinson TE, Liu RH. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.* 2009; 11:6332–339.
120. Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem.* 2004; 52:255-260.
121. Young JF, Dragsted LO, Danesivar B, Lauridsen ST, Hatisen M, Sandstrom B. The effect of grape-skin extract on oxidative status. *British J Nutr.* 2000; 84:505- 513.
122. Zenebe W, Pechanova O, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res.* 2003; 52:425–32.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA À BASE DE BAGAÇO DE SUCO DE UVA

1 INTRODUÇÃO

A uva está entre as frutas com maior teor de fenólicos. Esses compostos antioxidantes são capazes de seqüestrar radicais livres e, portanto, agir sobre os mecanismos que levam a doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), por exemplo, Alzheimer, aterosclerose, diabetes e alguns tipos de cânceres (HOGAN et al., 2009).

No cultivo mundial de frutas, a uva é uma das mais importantes, com 67 milhões de toneladas produzidas anualmente (FAO, 2007). Em 2009, o Brasil produziu aproximadamente 534 mil toneladas de uvas, cerca de 245 milhões de litros de vinho e 96 milhões de litros de outros derivados (UVIBRA, 2010).

O processo de fabricação do vinho gera uma quantidade de resíduo sólido estimada em 20% a 50% do peso inicial (MAZZA, 1995; GÓMEZ-PLAZA et al., 2006; LUQUE-RODRÍGUEZ et al., 2007). Na agroindústria brasileira do vinho cerca de 40% da uva processada se transforma em resíduo. No submédio São Francisco são mais de 3.360 toneladas de material por safra. Atualmente, parte deste material é utilizado na adubação dos parreirais e parte é queimado. A ampliação das áreas de cultivo e da capacidade de processamento das vinícolas irá elevar a quantidade dos resíduos na região (EMBRAPA, 2007).

Os subprodutos da vinificação e da produção de suco consistem basicamente de cascas, sementes e caules de uva. Estes contêm grandes quantidades de diferentes compostos fenólicos, que desempenham papel fundamental nas propriedades sensoriais das uvas e dos vinhos, como adstringência e cor (CAPOTE et al., 2007; LUQUE-RODRIGUEZ et al., 2007). Ácido linoléico e fenólicos, como antocianinas, flavonóides e estilbenos, componentes naturalmente presentes na uva, permanecem no bagaço após a produção dos vinhos e sucos em diferentes concentrações, dependendo do processo de fabricação (ISHIMOTO, 2007; LUQUE-RODRIGUEZ et al., 2007). Os glicosídeos de flavonóis e as antocianinas estão entre os compostos fenólicos

mais determinados e estudados nas uvas, por sua destacada atividade antioxidante e por suas propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas (NEGRO et al., 2003; AMICO et al., 2004; SILVA et al., 2005).

A semente de uva é composta basicamente de 40% de fibra, 16% de óleo essencial, 11% de proteína, 7% de um complexo de compostos fenólicos, como taninos, açúcares, sais minerais e outras substâncias. O óleo essencial contém alto valor agregado e é comumente usado em cosméticos e indústrias farmacêuticas. A pele da uva ou casca é uma fonte de antocianidinas e antocianinas, pigmentos naturais com propriedades antioxidantes. Os caules são ricos em compostos tânico, que incluem compostos fenólicos com alto potencial nutracêutico e farmacológico (MURGA et al, 2000.; JU e HOWARD, 2003).

A recuperação de compostos antioxidantes dos desperdícios contínuos da indústria de vinho pode representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente, visto que nas vinícolas as grandes quantidades de resíduos gerados apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, em termos ecológicos e econômicos. Esta situação justifica o crescente interesse em explorar os subprodutos da vinificação (ALONSO et al., 2002). Situação semelhante, porém em menor proporção é pertinente a indústria do suco de uva.

Eficiente e de baixo custo, a utilização dos resíduos da agroindústria são de importância indiscutível para maior rentabilidade e menor impacto ambiental (ALONSO et al., 2002). Além desses benéficos, o uso do bagaço de uva pode contribuir com importantes compostos, como os fenólicos, para reduzir ou prevenir DCNT.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- ✓ Produzir e avaliar capacidade antioxidante de uma bebida à base de farinha de bagaço de suco de uva.

2.2 ESPECÍFICOS:

- ✓ Analisar a qualidade microbiológica do bagaço de suco de uva;
- ✓ Analisar uma bebida sabor uva comercial;
- ✓ Determinar a composição proximal e características físico-químicas das amostras;
- ✓ Analisar sensorialmente a aceitação das bebidas;
- ✓ Quantificar os fenólicos totais dos produtos;
- ✓ Analisar a capacidade antioxidante das bebidas;
- ✓ Avaliar a estabilidade da capacidade antioxidante do produto desenvolvido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA

Bagaço de uva proveniente do processamento de suco de uva, da espécie *Vitis labrusca*, cepa da variedade Izabel, safra 2008/2009 foi doado por Produtos Alimentícios Superbom Indústria e Comércio Ltda. Este subproduto foi transportado congelado de Santa Catarina para São Paulo e mantido sob refrigeração à -4 °C e uma amostra foi retirada para análise microbiológica.

Posteriormente, o material foi encaminhado para Liotécnica Tecnologia em Alimentos onde foi submetido à liofilização. O material liofilizado foi triturado em moinho Maxi-Grinder Solo® e peneirado em vibrador Octagon Digital da Endocotts para padronização de partículas. Utilizou-se tamis de 425µm, que corresponde a 35 *tyler*.

Esses procedimentos resultaram em uma farinha de bagaço de suco de uva (FBSU) (Produto com Depósito de pedido de patente de invenção. Farinha de bagaço (casca e semente) de suco de uva e vinho como ingredientes para elaboração de alimentos funcionais, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI/SP, em 2007.), que foi a principal matéria-prima do presente estudo.

Um suco feito a partir de um preparado comercial em pó sabor uva de baixa caloria foi utilizado para comparação nos testes de caracterização da bebida de FBSU.

3.1.1 Análise microbiológica

Análises microbiológicas de bolores e leveduras, contagem total de mesófilos aeróbios, *Salmonella sp* e coliformes foram realizadas de acordo com APHA (2001) e SILVA et al. (2001), atendendo padrões microbiológicos para alimentos (Resolução RDC n. 12 de 02/01/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA), pela empresa CDL – Central de Diagnósticos Laboratoriais.

3.2 BEBIDA À BASE DE FARINHA DE BAGAÇO DE SUCO DE UVA (FBSU)

A bebida foi produzida e homogeneizada em moinho coloidal pela Food Intelligence - Consultoria Técnica em Alimentos S/S Ltda (São Paulo, SP) a partir dos seguintes ingredientes: 4,75% de FBSU; 0,08% de goma xantana; 0,02% de sucralose; 0,15% de ácido cítrico e 95,00% de água potável.

3.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

Teores de umidade, cinzas, lipídios e proteína foram determinados de acordo com os métodos 950.46, 923.03, 920.39C e 960.52 da AOAC, respectivamente (AOAC, 2003) e carboidratos totais foram calculados por diferença.

3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

3.4.1 Potencial hidrogeniônico

O pH foi determinado por leitura direta utilizando-se um pHmetro digital da marca Gehaka, modelo PG1800.

3.4.2 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado por refratometria, pela Food Intelligence - Consultoria Técnica em Alimentos S/S Ltda.

3.4.3 Cor

A cor da superfície do produto foi avaliada em colorímetro Hunter Lab - Color Quest II. Os resultados expressos em valores L^* , a^* e b^* (Bible e Singha, 1993) onde os valores de L^* (luminosidade ou brilho) variam do preto (0) ao branco (100), os valores do croma a^* variam do verde (-60) ao vermelho (+60) e os valores do croma b^* variam do azul ao amarelo, ou seja, de -60 a +60, respectivamente.

3.5 ANÁLISE SENSORIAL

Os testes sensoriais foram realizados no laboratório de Técnica Dietética em cabines individuais com lâmpadas fluorescentes (luz do dia), com 51 provadores não treinados, em uma única sessão. Cada indivíduo recebeu um copo de bebida à base de FBSU e um copo de suco de uva comercial, ambos codificados com números aleatórios de três dígitos, contendo cerca de 30 mL da amostra. Os atributos de aparência, odor e aroma, sabor e gosto foram avaliados por meio de um teste em escala hedônica estruturada de nove categorias: 1 – desgostei muitíssimo a 9 – gostei muitíssimo (DUTCOSKY, 1996).

Os provadores foram estudantes, funcionários e professores da Faculdade de Saúde Pública – USP. Estes foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1) de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP), conforme as normas de resolução 196 de 10/10/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres vivos. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo referido comitê no protocolo sob o número 1853 (anexo 2).

3.6 OBTENÇÃO DE EXTRATOS

A quantificação de compostos fenólicos e análises da atividade antioxidante foram realizadas a partir de extratos da bebida de FBSU e do suco comercial.

O seguinte procedimento foi utilizado: 20 mL de solvente (extrato etanólico 50% (v/v), acetona 50% (v/v) ou 100% água destilada) foram adicionados a 5 mL da amostra, deixados por 15 minutos em agitador magnético e depois mais 15 minutos em banho de ultrasson, centrifugados por 5 minutos a 900 rpm e filtrados em papel filtro qualitativo. Ao material sedimentado foram adicionados novamente 20 mL de solvente e repetiram-se todos os passos. Ao final, os sobrenadantes foram coletados em balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com o mesmo solvente.

Os extratos foram estocados sob refrigeração a -4 °C. Para avaliar a estabilidade da bebida após armazenamento, novos extratos foram feitos depois de 30 dias seguindo o mesmo protocolo.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A obtenção do total de compostos fenólicos foi realizada pelo método colorimétrico, desenvolvido por SINGLETON e ROSSI (1965), com o reagente Folin-Ciocalteu e adaptado por GENOVESE et al. (2003). O método baseia-se

na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina, sendo o mais utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. A intensidade da cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 750 nm.

O teor total de compostos fenólicos foi calculado utilizando-se a equação obtida pela curva padrão, a partir da relação entre a absorbância e a concentração do padrão ácido gálico utilizado para esta análise. O resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG).

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.8.1 Teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical (ORAC)

O teste usa a Fluoresceína (FL), fotossintética, marcadora de fluorescência, como alvo dos radicais. Ele mede a diminuição da emissão de fluorescência de FL adicionada a amostra em presença de um composto gerador de radicais livres [2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorida - AAPH]. A habilidade antioxidante da amostra é calculada a partir da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência ("Area Under the Fluorescence Decay Curve" – AUC) com emissão a 515 nm e excitação a 493 nm, comparada ao padrão (trolox). O teste combina o tempo de inibição e a percentagem (%) de inibição da ação do radical pelo antioxidante e usa a área sob a curva para a quantificação (HUANG et al., 2005).

No presente estudo, o branco foi preparado com 3000 µL de tampão fosfato, 15 µL de FL (2,93 mg/L) e 300 µL de AAPH (60 g/L). A AUC foi calculada após 60 minutos de leitura, em intervalos de 5 minutos, na temperatura de 37°C em fluorímetro modelo FL-55 da Perkin-Elmer – EUA com célula de quartzo de 10 mm termostatizada. Realizou-se a análise utilizando 2700 µL de tampão, 300 µL de amostra convenientemente diluída, 15 µL de FL e 300 µL de AAPH, repetindo-se a medição feita para o branco. O resultado foi

comparado com a área sob a curva de um padrão com 2700 µL de tampão, 300 µL de Trolox 20 µM, 15 µL de FL e 300 µL de AAPH (OU et al., 2001).

3.8.2 Capacidade antioxidante total (TAS)

A TAS foi mensurada analiticamente utilizando-se o *kit Total Antioxidant Status* (TAS – NX2332) da Randox Laboratories Ltd. (UK).

A avaliação da TAS é realizada por meio da exposição da amostra a um radical livre produzido em quantidades controladas. A incubação do 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] ou ABTS[®] com a enzima metahemoglobina peroxidase produz o radical ABTS⁺, que apresenta coloração azul-esverdeada estável, a absorbância foi lida a 600 nm em espectrofotômetro.

Para calcular a TAS foram utilizadas as fórmulas abaixo:

$$\text{Fator} = \text{concentração do Padrão} / (\Delta A_{\text{branco}} - \Delta A_{\text{padrão}})$$

O ΔA obtido para o branco da reação deve ser subtraído do valor obtido para as amostras, aplicando-se a seguinte equação: TAS (mmol/L) = Fator x $(\Delta A_{\text{branco}} - \Delta A_{\text{amostra}})$

3.8.3 Capacidade de sequestrar o radical DPPH

A capacidade de sequestrar radicais livres pela bebida de FBSU foi analisada empregando-se o radical estável DPPH (2,2-difenil 1-2-picrilhidrazil) conforme descrito por BRAND-WILLIAMS et al. (1995) adaptado por YAMAGUCHI et al. (1998). Alíquotas dos extratos (750µL) em diferentes concentrações foram adicionadas de 1,5mL de solução DPPH na concentração de 20mg/mL em metanol.

Ao reagir com os antioxidantes do meio, o DPPH muda de coloração, podendo passar de violeta escuro para amarelo claro. Após 20 minutos de reação na ausência de luz verifica-se a absorbância no comprimento de onda de 517nm.

A porcentagem da atividade antioxidante (AA) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% AA = [1 - (\frac{\text{abs. da amostra} - \text{abs. do branco da amostra}}{\text{abs. do branco do ensaio DPPH}})] \times 100$$

onde: abs. = absorbância

branco da amostra = 0,75mL de amostra + 1,5mL de metanol

branco do ensaio = 0,75mL de metanol + 1,5mL de solução DPPH

A %AA *versus* a concentração do extrato foram relacionadas graficamente para o cálculo do IC₅₀. Os resultados foram expressos em mg de matéria seca do extrato por mg de DPPH.

3.8.4 Sistema β-caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante determinada pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por MARCO (1968) e modificada por MILLER (1971). Como substrato, utilizou-se emulsão de β-caroteno/ácido linoléico. Em 28 μL da solução de β-caroteno (preparada na proporção de 20 mg de β-caroteno/mL de clorofórmio) adicionou-se 28 μL de ácido linoléico e 200 mg de Tween 40 (emulsificante). Em seguida, o clorofórmio foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e acrescentado 140 mL de água oxigenada (água destilada tratada com oxigênio por 30 minutos). No tubo de ensaio, 5 mL desta solução foi adicionada a 1 mL dos extratos diluídos. Após homogeneização, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, sendo esta a leitura do tempo zero (tempo inicial). Os tubos foram mantidos à 50 °C e as amostras lidas a cada 30 minutos, por 2 horas.

A oxidação do β-caroteno, obtida pelas medidas espectrofotométricas, indica a velocidade de transformação desse composto sob condições oxidantes (oxigênio e temperatura). Para o cálculo da porcentagem da inibição da oxidação lipídica (% IOL) utilizou-se a fórmula:

$$\% IOL = \left[\frac{(\text{decaimento abs.} \cdot \text{controle} - \text{decaimento abs. amostra})}{\text{decaimento da abs. do controle}} \right] \times 100$$

* abs. = absorbância

Controle = 1mL de metanol

As emulsões e soluções foram preparadas diariamente.

3.9 Análise dos dados

Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão. O dados foram armazenados via programa Microsoft Excel, versão 2000 e analisados os efeitos dos extratos da bebida de FBSU e do suco comercial pelo *software Statistical Package for the Social Sciences SPSS*- versão 14.0 for Windows. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey.

Realizou-se o teste *t* de Student pareado para avaliar a significância da diferença entre os resultados das análises no dia posterior a produção da bebida e após armazenamento. O nível de significância estabelecido foi $\alpha = 5\%$.

Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmo neperiano (ln) e o teste reaplicado.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA MATÉRIA-PRIMA

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram que a qualidade microbiológica do bagaço do suco de uva estava dentro dos padrões recomendados pela Resolução RDC n. 12 de 02/01/2001 da ANVISA, constituindo, assim, uma matéria-prima segura para consumo humano.

Tabela 1 – Análise microbiológica do bagaço de uva proveniente do processamento de suco de uva.

Indicadores Higiênicos		Resultados (g)
Contagem Padrão em Placas		4,10 ³
Bolores e Leveduras		5,10 ³
Coliformes totais		9
Indicadores Sanitários		Resultados (g)
Coliformes fecais		<3
Staphylococcus coag. Positiva		<100
Bacillus cereus		<100
Clostridium SR		<100
Salmonella sp (25 g)		Ausente

4.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

Observa-se que a bebida de FBSU quando comparada ao suco de uva comercial, possui aproximadamente 97% e 88% mais proteínas e lipídios, respectivamente. O suco comercial é composto por maior quantidade de carboidratos totais. Os dados da composição proximal da bebida de FBSU e do suco comercial de baixa caloria estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Médias ($\pm$ desvio padrão) da composição proximal de bebida à base de bagaço de suco de uva e suco comercial de uva.

	% Base seca		% Base úmida	
	Bebida FBSU	Suco comercial	Bebida FBSU	Suco comercial
Umidade	-	-	95,55 $\pm$ 0,06 ^A	95,48 $\pm$ 0,91 ^A
Cinzas	2,53 $\pm$ 0,15 ^b	0,78 $\pm$ 0,09 ^a	0,12 $\pm$ 0,01 ^B	0,04 $\pm$ 0,00 ^A
Proteínas	10,08 $\pm$ 0,09 ^b	0,33 $\pm$ 0,04 ^a	0,45 $\pm$ 0,00 ^B	0,01 $\pm$ 0,01 ^A
Lipídios	11,13 $\pm$ 0,38 ^b	1,24 $\pm$ 0,15 ^a	0,50 $\pm$ 0,02 ^B	0,06 $\pm$ 0,01 ^A
Carboidratos ¹	76,26	97,65	3,38	4,41

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras em base seca

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras em base úmida

¹ Calculado por diferença

4.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

As propriedades físico-químicas, da bebida de FBSU e do suco comercial de uva foram analisadas e podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 – Médias ($\pm$ desvio padrão) dos teores de sólidos solúveis, pH e cor da bebida de FBSU e do suco comercial

	°Brix	pH	cor		
			L*	a*	b*
Bebida FBSU	$1,9 \pm 0,00^a$	$3,23 \pm 0,01^b$	$33,52 \pm 0,15^b$	$10,52 \pm 0,13^b$	$1,37 \pm 0,08^b$
Suco comercial	$4,8 \pm 0,00^b$	$2,95 \pm 0,01^a$	$25,64 \pm 0,01^a$	$2,04 \pm 0,02^a$	$-1,62 \pm 0,05^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

4.3.4 Avaliação do pH e cor após armazenamento

Propriedades físico-químicas da bebida de FBSU foram avaliadas no dia seguinte a sua fabricação e após 30 dias de armazenamento em freezer a -4°C . Os valores de pH mantiveram-se estáveis, $3,23 \pm 0,01$ *versus* $3,24 \pm 0,01$; $p > 0,05$; nos dias 1 e 30, respectivamente. Enquanto houve diminuição significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de cor da bebida (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Dados de cor da bebida de FBSU um dia após a produção das bebidas e depois de trinta dias de armazenamento.

4.4 ANÁLISE SENSORIAL

Participaram da análise sensorial 48 mulheres e 3 homens, com idade média de $29 \pm 7,5$ anos, em sessão única. Ambas as bebidas receberam, na média, notas acima de seis em todos os parâmetros (tabela 4). Nota seis corresponde a percepção – gostei ligeiramente – e foi considerada o ponto de corte para o presente estudo.

Tabela 4 – Médias ($\pm$ desvio padrão) das notas atribuídas a bebida de FBSU e ao suco comercial de acordo com escala hedônica estruturada de nove pontos pelos 51 participantes.

	Aparência	Odor e Aroma	Sabor e Gosto
Bebida FBSU	$6 \pm 1,9^a$	$6 \pm 1,8^a$	$6 \pm 2,2^a$
Suco comercial	$7 \pm 1,5^b$	$7 \pm 1,5^b$	$6 \pm 1,9^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Os parâmetros aparência, odor e aroma, sabor e gosto receberam respectivamente 59%, 48% e 68% de notas iguais ou maiores a seis para a bebida de FBSU. O suco comercial recebeu 86% de notas ≥ 6 para aparência, 87% para odor e aroma, 79% para sabor e gosto. A porcentagem de distribuição das notas da bebida de FBSU e do suco comercial estão apresentadas nos gráficos 2 e 3, respectivamente.

Gráfico 2 – Distribuição percentual das notas atribuídas à bebida de FBSU de acordo com escala hedônica estruturada de nove pontos.

Gráfico 3 – Distribuição percentual das notas atribuídas ao suco comercial de uva de acordo com escala hedônica estruturada de nove pontos.

4.5 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O extrato de acetona da bebida de FBSU possui 24,8% e 51,5% mais compostos fenólicos do que os extratos de etanol e água, respectivamente, da mesma bebida. Como esperado, os extratos da bebida de FBSU têm significativamente mais fenólicos que os extratos do suco comercial (tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de compostos fenólicos totais em $\mu\text{g}/\text{mg}$ EAG dos extratos da bebida de FBSU e do suco comercial um dia após a produção das bebidas.

Bebida FBSU			Suco comercial		
$\mu\text{g}/\text{mg}$ de fenólicos EAG			$\mu\text{g}/\text{mg}$ de fenólicos EAG		
Extratos			Extratos		
Aquoso	Etanólico	Acetônico	Aquoso	Etanólico	Acetônico
$46,48 \pm 1,63^b$	$71,98 \pm 2,28^c$	$95,76 \pm 1,38^d$	$2,00 \pm 0,08^a$	$2,49 \pm 0,07^a$	$4,80 \pm 0,66^a$

EAG –Equivalentes de Ácido Gálico

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Os compostos fenólicos do extrato aquoso diminuíram 46,8% depois de 30 dias de armazenamento da bebida de FBSU, do etanólico reduziram 45,8% e do acetônico, 56,3%. Já a alteração dos fenólicos dos extratos do suco comercial após a estocagem não foi significativa (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Valores médios de fenólicos totais em $\mu\text{g}/\text{mg}$ EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) dos extratos da bebida de FBSU e do suco comercial de uva um dia após a produção das bebidas e depois de trinta dias de armazenamento.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Teste ORAC

A capacidade antioxidante medida pelo teste ORAC foi superior no extrato aquoso da bebida de FBSU, seguida pela capacidade do extrato etanólico e depois do extrato acetônico. Os extratos do suco comercial tiveram capacidade antioxidante inferior (tabela 6).

Tabela 6 - Médias ($\pm$ desvio padrão) da capacidade de absorbância do oxigênio radical – ORAC pela bebida de FBSU e pelo suco comercial de uva.

Bebida FBSU			Suco comercial		
Extratos (equivalentes de Trolox 20 mM)			Extratos (equivalentes de Trolox 20 mM)		
Aquoso	Etanólico	Acetônico	Aquoso	Etanólico	Acetônico
24588,6 $\pm$ 5264,1 ^{1,d}	17977,5 $\pm$ 2053,1 ^d	6132,7 $\pm$ 726,3 ^c	135,5 $\pm$ 6,7 ^a	839,5 $\pm$ 114,7 ^b	725,3 $\pm$ 27,2 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

¹Dados analisados como logaritmo neperiano (ln) das médias

4.6.2 Capacidade antioxidante total do plasma (TAS)

O extrato etanólico da bebida de FBSU apresentou capacidade antioxidante total 75,8% superior ao extrato aquoso e 56,0% inferior ao acetônico (tabela 7).

Tabela 7 – Médias ($\pm$ desvio padrão) da capacidade antioxidante total (TAS) da bebida de FBSU.

Extrato aquoso (mmol/L)	Extrato etanólico (mmol/L)	Extrato acetônico (mmol/L)
0,22 $\pm$ 0,0 ^a	0,91 $\pm$ 0,1 ^b	1,42 $\pm$ 0,1 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

4.6.3 Capacidade de sequestrar o radical DPPH

Os resultados da capacidade de sequestrar o radical DPPH pelos extratos da bebida de FBSU foram apresentados como IC₅₀ (tabela 8), ou seja, a concentração de amostra necessária para reduzir a 50% o DPPH presente inicialmente no meio. Portanto, quanto menor o IC₅₀ melhor a atividade antioxidante.

A concentração necessária de fenólicos para a realização do ensaio de captação do radical DPPH não foi atingida pelos extratos do suco de uva comercial.

Tabela 8 - Médias ($\pm$ desvio padrão) da capacidade de sequestrar o radical DPPH (IC_{50} ; mg de matéria seca/mg de DPPH) da bebida de FBSU.

Extrato aquoso (IC_{50} mg/mg DPPH)	Extrato etanólico (IC_{50} mg/mg DPPH)	Extrato acetônico (IC_{50} mg/mg DPPH)
$11,20 \pm 0,27^b$	$3,30 \pm 0,09^a$	$3,49 \pm 0,20^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

4.6.4 Sistema β -caroteno/ácido linoléico

Os extratos do suco comercial tiveram porcentagem de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico significativamente inferiores aos valores dos extratos da bebida de FBSU. Entre os extratos da bebida de FBSU, os valores dos extratos aquosos e etanólico foram estatisticamente iguais e o extrato acetônico teve maior % de inibição (tabela 9).

Tabela 9 – Médias ($\pm$ desvio padrão) da inibição da oxidação lipídica (IOL) pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico dos extratos da bebida de FBSU e do suco de uva comercial um dia após a produção das bebidas.

Bebida FBSU			Suco comercial		
Extratos (% de Inibição)			Extratos (% de Inibição)		
Aquoso	Etanólico	Acetônico	Aquoso	Etanólico	Acetônico
$64,51 \pm 2,97^c$	$66,37 \pm 4,35^c$	$74,64 \pm 4,45^d$	$31,24 \pm 3,39^{a,b}$	$25,97 \pm 2,66^a$	$35,79 \pm 3,29^b$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Após 30 dias de estocagem da bebida de FBSU, a porcentagem de IOL diminuiu significativamente em todos os extratos (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Inibição da oxidação lipídica (IOL) pelo sistema β -caroteno/ácido linolêico dos extratos da bebida de FBSU um dia e trinta dias após a produção das bebidas.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho tratou-se do desenvolvimento e avaliação da capacidade antioxidante de uma nova bebida produzida a partir de um subproduto da fabricação de suco de uva. O bagaço resultante deste processo é rico em antioxidantes naturais e fibras, por outro lado, é prejudicial ao meio ambiente.

Avaliou-se também um suco comercial de uva de baixa caloria. Isto porque esse estudo faz parte de uma pesquisa maior, na qual foi necessária a utilização de uma bebida consolidada comercialmente, sem capacidade antioxidante ou com capacidade significativamente menor do que a bebida de FBSU para servir de controle.

De acordo com o rótulo do suco comercial, um litro é composto por 5 g de carboidratos, zero de proteína e zero de lipídeo, totalizando 20 Kcal. Estes

dados corroboram com os valores de composição proximal encontrados neste estudo. A bebida de FBSU é isocalórica a esse suco.

Os sólidos solúveis das duas bebidas foram inferiores a variação de 12,2 a 17,3 °Brix encontrados por outros pesquisadores em diferentes sucos de uva (RIZZON e LINK, 2006; THRELFALL et al., 2007; SANTANA et al., 2008). A baixa quantidade de açúcares na bebida de FBSU se justifica por ser um subproduto, ou seja, a maioria dos açúcares da uva ficaram no suco. A bebida comercial analisada foi um preparado para suco em pó já diluído que possui somente 1% de polpa de uva no pó.

Os valores de pH da bebida de FBSU, tanto na produção quanto depois de 30 dias de armazenamento, estão dentro da faixa de diversos sucos de uva (pH de 3,09 a 3,50) (RIZZON e LINK, 2006; THRELFALL et al., 2007; SANTANA et al., 2008). O suco comercial apresentou pH inferior, provavelmente devido aos aditivos.

A cor de ambas as bebidas é bem característica, diferindo daquela encontrada em outros sucos de uva (THRELFALL et al., 2007). A intensidade da cor da bebida de FBSU diminuiu consideravelmente em todos os parâmetros após o armazenamento. As características deste produto, alta quantidade de água e presença de microorganismos, favorecem a alteração dos pigmentos. GOLLUCKE et al. (2008) também observaram redução da intensidade de cor de suco de uva, variedade Isabel, depois de estocado.

A bebida de FBSU e o suco comercial foram avaliados sensorialmente numa única sessão, com o objetivo de avaliar a aceitação por população similar ao perfil dos voluntários que seriam recrutados em outra etapa da pesquisa.

As duas bebidas receberam, na média, notas acima de seis para todos os parâmetros questionados. Valor considerado em uma escala hedônica estruturada de 9 pontos como um limite de qualidade e de comercialização para alimentos (MUÑOZ et al. 1992). Entretanto, a distribuição das notas foi bastante distinta. A bebida de FBSU recebeu 68% de notas iguais ou acima de 6, por outro lado, recebeu 16% de nota 2 para o parâmetro sabor e gosto. O suco comercial recebeu porcentagem de notas com melhor distribuição. Acredita-se que esta diferença entre a distribuição das notas deve-se ao fato da bebida comercial

possuir características sensoriais conhecidas pelos consumidores e da bebida de FBSU ter um sabor novo, ainda desconhecido. Ainda assim, a bebida de FBSU foi bem aceita sensorialmente pela maioria dos provadores, 67% deram nota seis ou acima para sabor e gosto e 59% para aparência.

A quantidade de fenólicos totais das amostras foi avaliada. O teor de fenólicos do suco de uva comercial, em todos os extratos não apresentou diferença estatística e foi bastante inferior ao encontrado nos extratos da bebida de FBSU. Estes resultados já eram esperados, uma vez que foi escolhido um suco com sabor de uva, mas que contivesse quantidade pequena da fruta.

O extrato feito com 50% de acetona: 50% de água (v/v), denominado acetônico, foi o que apresentou maior quantidade de fenólicos totais, seguido pelo etanólico (50% etanol: 50% água v/v) e aquoso (100% água). ROCKENBACH et al. (2008) ao avaliarem a influência do solvente no conteúdo total de polifenóis de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) encontraram a mesma ordem de eficiência para extração de fenólicos. Os mesmos autores concluíram que o sistema solvente utilizado na extração de bagaço de uva influencia diretamente o conteúdo de fenólicos totais. Tal fato torna difícil encontrar um método único que seja adequado para a análise de um grupo diverso de fenólicos (ANTOLOVICH et al., 2000), como para o bagaço de uva que possui uma grande variedade desses compostos (ORAK, 2007).

Valores de fenólicos totais encontrados por CAMPOS et al. (2008) ao avaliarem diferentes extratos de bagaço de uva Cabernet sauvignon resultantes da vinificação foram inferiores aos observados nos três extratos da bebida de FBSU, nos dois momentos estudados. ISHIMOTO (2007) constatou que farinha do bagaço proveniente do suco de uva possui aproximadamente 105% mais polifenóis que farinha do bagaço do vinho. 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.

O teor de compostos fenólicos dos extratos da bebida de FBSU estocada por trinta dias reduziu significativamente. Durante o armazenamento pode ocorrer mudanças no aroma, cor e sabor do suco de uva devido à redução na concentração de antocianinas monoméricas e formação de pigmentos poliméricos (FRANCIA-ARICHA et al., 1997). Vários fatores interferem na estabilidade dos fenólicos, como temperatura, luz, oxigênio, íons metálicos, enzimas, valor de pH, etc (JACKMAN et al., 1987; HAMAMA e NAWAR, 1991; HEREDIA et al., 1998). Embora as bebidas de FBSU estivessem armazenadas em frascos âmbar, a luz e o oxigênio podem ter atravessado a embalagem e contribuído para a perda dos compostos fenólicos.

A atividade antioxidante das amostras foi testada por diferentes métodos. Dentre os ensaios, três medem a capacidade de sequestrar radicais livres (teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical – ORAC, capacidade antioxidante total – TAS e capacidade de sequestrar o radical DPPH) e um avalia a inibição da peroxidação lipídica (sistema de oxidação β -caroteno e ácido linoléico).

Segundo OU et al. (2001), os resultados da capacidade da amostra de proteger a fluoresceína do ataque antioxidante do radical livre AAPH, são expressos em comparação a um antioxidante padrão, normalmente Trolox na concentração 20 milimolar. O presente estudo seguiu tal recomendação e constatou que o extrato aquoso da bebida de FBSU foi o que conseguiu a maior capacidade antioxidante pelo teste ORAC, seguido pelo etanólico e depois o acetônico.

A capacidade antioxidante do suco de uva comercial foi inferior em todos os extratos avaliados ao serem comparados com os extratos da bebida de FBSU pelo teste ORAC. Estes resultados confirmam o esperado, uma bebida artificial sabor uva com pouca ou nenhuma atividade antioxidante.

A atividade antioxidante não depende apenas da quantidade de fenólicos, mas também dos tipos de compostos, quantidade e posição de hidroxilas e anéis aromáticos (SOUSA et al., 2004; BASTOS et al., 2007). Segundo HUANG et al., (2005) alguns compostos fenólicos reagem com o reagente de Folin, mas não apresentam atividade antioxidante. Portanto, pode não haver

necessariamente uma boa correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante de uma amostra.

Quando se utilizou o TAS para a avaliação da capacidade antioxidante total da bebida de FBSU, o extrato aquoso apresentou capacidade antioxidante 84,5% inferior a capacidade do extrato acetônico e o extrato etanólico, 35,9% menor. Por este método, a capacidade antioxidante dos extratos seguiu a mesma ordem de eficiência da extração de compostos fenólicos.

A capacidade de sequestrar o radical DPPH pelos extratos da bebida de FBSU também foi maior no extrato de acetona, seguido pelo de etanol e por último, no extrato aquoso. LLOBERA e CAÑELLAS (2007) verificaram IC₅₀ (mg de matéria seca/mg de DPPH) de 1,41 para bagaço de uvas tintas provenientes da vinificação. A melhor capacidade antioxidante observada por estes pesquisadores pode ser justificada pelo fato de terem estudado o bagaço *in natura*, enquanto no presente trabalho, avaliou extratos de uma bebida com somente 4,8% de FBSU que obteve valores de (mg de matéria seca/mg de DPPH) de 11,2 a 3,3.

A capacidade de inibição da peroxidação lipídica (IOL) foi avaliada nas duas bebidas pelo sistema de oxidação β -caroteno e ácido linoléico. A porcentagem de IOL dos extratos do suco comercial foi inferior a todos os extratos da bebida de FBSU. Os extratos aquoso e etanólico apresentaram porcentagem de IOL significativamente iguais e aproximadamente 12% menor em relação ao extrato acetônico.

ROCKENBACH et al. (2008) ao estudarem a influência do solvente na atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota, pelo sistema de oxidação β -caroteno e ácido linoléico, verificaram que os extratos obtidos com acetona apresentaram poder de inibição aproximadamente 50% menor do percentual obtido com o extrato etanólico. A metodologia de extração e variedade da uva diferentes do presente estudo podem ser a explicação do resultado contraditório da % de IOL entre esses dois trabalhos.

Após 30 dias de armazenamento da bebida de FBSU, os novos extratos tiveram capacidade de IOL significativamente menores, seguindo

comportamento semelhante à presença de compostos fenólicos totais da bebida estocada. Mesmo assim, a capacidade de IOL dos extratos da bebida armazenada foi acima de 40%.

Verifica-se que o potencial antioxidante de uvas varia de acordo com o ensaio realizado. Isto ocorre devido à contribuição de diferentes compostos fenólicos e flavonóides (KEDAGE et al., 2007). O bagaço de uva é considerado uma boa fonte de importantes compostos a baixo custo, o que justifica uma completa caracterização da composição dos extratos para definir os melhores processos de extração e metodologias (CAMPOS et al., 2008).

6 CONCLUSÃO

A bebida produzida a partir de FBSU foi aceita sensorialmente e possui capacidade antioxidante. Há perda de parte desta capacidade depois de trinta dias de armazenamento, entretanto, a bebida continua com considerável poder antioxidante, constituindo-se em um alimento potencialmente benéfico à saúde.

7 REFERÊNCIAS

1. Alonso AM, Guillen DA, Barroso CG, Puertas B, Gracia A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem* 2002; 50:5832–5836.
2. Amico V. et al. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar ‘Nerello Mascalese’. *Food Chem.* 2004; 88(4): 599-607.
3. Antolovich M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Critical Review. Analyst* 2000; 125:989-1009.
4. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12 de 02/01/2001 da ANVISA. [acesso em 15/04/2007] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm
5. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC, 2003.
6. APHA - American Public Health Association. DOWNES & ITO (Coord.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 1st ed. Washington, DC, 2001. 676p.
7. Bastos DHM, Saldanha LAS, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*. 2007; 12:423-432.
8. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 1995; 28:25-30.
9. Campos LMAS, Leimann FV, Pedrosa RC, Ferreira SRS. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Biores Technol.* 2008; 99: 8413–8420.
10. Capote FP, Luque-Rodríguez JM, Luque de Castro MD. Determination of phenolic compounds in grape skin by capillary electrophoresis with simultaneous dual fluorescence and diode array absorption detection after dynamic superheated liquid leaching *J Chromatography*. 2007; 1139:301–307
11. Dutcosky, S.D. Método Sensoriais. In: *Análise Sensorial de Alimentos*. 20 ed. Curitiba: Editora Universitária Champaign, 1996.
12. EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [homepage na internet] [acesso em 10/11/2010] Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br/embrapa/imprensa/noticias/2007/junho/3a-semana/noticia.2007-06-18.2890923758>.
13. FAO - Food and Agriculture Organisation, 2007. [homepage na internet] FAOSTAT database. Faostat agriculture data – croops and crops processed – grape an wine.[acesso em 20/10/2009] Disponível em:<http://apps.fao.org>.
14. Francia-Aricha EM, Guerra MT, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. *J Agric. Food Chem.* 1997; 45:2262.
15. Genovese MI, Santos RJ, Massimotto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Braz J Phar Sci.* 2003; 39:167-169.

16. Gollicke APB, Souza JC, Tavares DQ. Sensory stability of concord and isabel concentrated grape juices during storage. *J Sensory Studies*. 2008; 23340–353
17. Gómez-Plaza E, Miñano A, López-Roca JM. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chem*. 2006; 97(1): 87-94.
18. Hamama AA, Nawar W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem* 1991; 39: 1063-1069.
19. Heredia FJ, Francia-Aricha EM, Rivas-Gonzalo JC, Vicario IM, Santos-Buelga C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - pH effect. *Food Chem*. 1998; 63(4):491-498.
20. Hogan S, Zhang L, Janrong L, Zoeklein B, Zhou K. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes *Food Scienc Technol*. 2009; 421269–1274.
21. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1841-56.
22. Ishimoto EY. Efeito hipolipemiante de subprodutos da uva em hamsters. [Tese de doutorado] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.
23. Jackman RL, Yada RY, Tung MA, Speers RA. Anthocyanins as food colorants – a review. *J Food Biochem*. 1987; 11: 279–308.
24. Ju Z, Howard L. Effect of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51:5207–5213.
25. Kedage VV, Dixit GB, Omas PA, Mhatre D M. A Study Of Antioxidant Properties Of Some Varieties Of Grapes (*Vitis Vinifera* L.) *Crit Rev Food Sci Nut* 2007; 47:175–185.
26. 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.
27. Luque-Rodriguez JM, Luque de Castro MD, Perez-Juan P. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues *Biores Technol* 2007; 98: 2705–2713.
28. Mazza, G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1995; 35(4):341-371.
29. Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1971; 48:91.
30. Muñoz AM, Civille VG, Carr BT. Sensory evaluation in quality control. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240 p.
31. Murga R, Ruiz R, Beltrán S, Cabezas JL. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agric Food Chem*. 2000; 48(8):3408–3412.
32. Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Biores Technol*, 2003; 87:41-44.

33. Orak HH. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae* 2007; 111(3): 235-241.
34. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; 49:4619-26.
35. Rizzon LA, Link M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. *Ciênc Rural*. 2006; 36(2): 689-692.
36. Rockenbach II, Silva GL, Rodrigues E, Kuskoski EM, Fett R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2008; 28(Supl.):238-244.
37. Santana MTA, Siqueira HH, Reis KC, Lima LCO, Silva RJL. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. *Ciênc. agrotec.* 2008; 32(3):882-886.
38. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001, 229 p.
39. Silva S, Matias A, Nunes A. Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 2005; 20(1):17-33.
40. Singleton VL, Rossi Jr, JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16:144-158.
41. Sousa WR, Rocha C, Cardoso CL, Silva DHS, Zanoni MVB. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *J. Food Comp. Anal.* 2004; 17(5): 619-633.
42. Threlfall RT, Morris JR, Meullenet JF, Striegler RK. Sensory Characteristics, Composition, and Nutraceutical Content of Juice from *Vitis rotundifolia* (Muscadine) Cultivars *Am. J. Enol. Vitic.* 2007; 58(2):268-273.
43. UVIBRA - União Brasileira de Viticultura [homepage na internet] [acesso em 18/11/2010] Disponível em: http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm
44. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosc, Biotech, and biochem*, 1998; 62:1201-1204.

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE BEBIDA À BASE DE SUBPRODUTO DE SUCO DE UVA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES DE RISCO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM MULHERES SAUDÁVEIS

1 INTRODUÇÃO

No século passado, doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), como hipertensão, doença coronariana e acidente vascular cerebral tornaram-se bem mais prevalentes. Apesar do tratamento agressivo aos fatores de risco das doenças cardiovasculares (DCV), os encargos sociais dessas doenças continuam elevados (DOHADWALA e VITA, 2009).

Consideradas como epidemia na atualidade, as DCNT constituem sério problema de saúde pública, tanto nos países ricos quanto nos de média e baixa renda. No Brasil, nas últimas décadas, a mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias caiu de 46% (em 1930) para 5,3% (em 2005), enquanto as mortes por doenças e agravos não-transmissíveis chegaram em 2005 a representar dois terços da totalidade das causas conhecidas. As DCNT passaram a determinar a maioria das causas de óbito e incapacidade prematura – ultrapassando as taxas de mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias – e a representar uma grande parcela das despesas com assistência hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS) e no Setor Suplementar (BRASIL, 2008).

Este quadro mundial tem estimulado o interesse a abordagens no estilo de vida e alimentares para a redução do risco cardiovascular. Evidências recentes sugerem benefícios cardioprotetores de dietas ricas em frutas e vegetais naturais, como as uvas. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de vinho, suco de uva e outros alimentos que contém polifenóis estão associados à diminuição do risco de doenças cardiovasculares (DOHADWALA e VITA, 2009).

Trabalhos experimentais indicam que os polifenóis da uva podem reduzir a aterosclerose por vários mecanismos, incluindo inibição da oxidação da LDL e outros efeitos favoráveis sobre o balanço redox, melhoria da função endotelial,

redução da pressão arterial, inibição da agregação plaquetária, reduzindo a inflamação e ativação de proteínas que previnem a senescência celular (GIEHL et al., 2007; DOHADWALA e VITA, 2009).

Na produção de vinhos e suco de uva são geradas grandes quantidades de bagaço residual, o qual causa impacto ambiental negativo. Considerando-se a expressiva vitivinicultura e produção de sucos de uva, bem como o alto teor de polifenóis, fibras e o baixo custo do bagaço residual, pode-se dizer que os subprodutos da vinificação e sucos de uva estão entre as mais significativas fontes de antioxidantes naturais (MADEJÓN et al., 2001, 2002; DIÁZ et al., 2002; YILMAZ e TOLEDO, 2004).

No Brasil, apesar da crescente produção de vinhos e sucos em escala industrial, há poucos dados sobre o aproveitamento de seus resíduos na forma de antioxidante alimentar ou suplemento nutricional.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- ✓ Estudar os efeitos de uma bebida à base de farinha de bagaço de suco de uva (FBSU) sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco para doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a concentração de triglicérides, colesterol total e suas frações, proteína C-reativa, interleucina -6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) no plasma das voluntárias, antes e após as intervenções;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica;
- ✓ Quantificar as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidases (GSH-Px) e catalase (CAT) nos eritrócitos;
- ✓ Analisar a capacidade antioxidante do plasma (TAS);

- ✓ Avaliar danos oxidativos ao DNA de linfócitos;
- ✓ Analisar o consumo alimentar dos indivíduos nos períodos em que receberam bebida à base de FBSU, suco controle e durante o *washout*.

3 MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO E PROTOCOLO DO ESTUDO

Dezessete (n=17) mulheres saudáveis, recrutadas na Faculdade de Saúde Pública da USP, foram randomizadas em um estudo clínico *crossover*, controlado, com duração de sete semanas, nas quais ingeriram diariamente 300 mL de bebida à base de FBSU ou suco de uva comercial por duas semanas, com *washout* de uma semana antes do início do estudo e outro *washout* de quatorze dias entre as intervenções (Figura 1).

Os critérios de inclusão foram: voluntárias do sexo feminino, 18 a 40 anos, clinicamente saudáveis, sem tratamento medicamentoso, com índice de massa corporal (IMC) entre 19 a 30 kg/m²; e exclusão: gestantes, nutrízes, vegetarianos, atletas, fumantes, hipertensos, indivíduos com IMC <19 ou >30 kg/m², que fizessem uso de medicamento ou suplemento com propriedades antioxidantes e/ou hipolipemiante.

As voluntárias receberam orientação para manter a dieta habitual, porém não ingerir uva, uva passa, suco de uva, vinho e outros produtos que contivessem uva na sua formulação durante os períodos de intervenção e *washout*.

As mesmas foram esclarecidas individualmente sobre os objetivos, riscos e benefícios desse estudo. Nesse encontro, as voluntárias informaram sobre seu estado de saúde e uso de medicamentos/suplementos, coletou-se os dados antropométricos e aplicou-se um questionário sobre nível de atividade física (anexo 3). O nível de atividade física foi avaliado segundo critérios da Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico – VIGITEL (BRASIL, 2006).

Figura 1 – Fluxograma do estudo

Os indivíduos foram questionados sobre a disponibilidade para participar de todas as etapas da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 4), de acordo com o as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP), conforme as normas de resolução 196 de 10/10/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres vivos. Este

projeto de pesquisa foi aprovado pelo referido comitê no protocolo sob o número 1853 (anexo 2). Foi registrado no *Australian New Zealand Clinical Trials Registry* (ANZCTR) sob o protocolo: ACTRN12609000824268 (anexo 5).

3.2 BEBIDA À BASE DE SUBPRODUTO DO SUCO DE UVA

A matéria-prima utilizada foi bagaço de uva proveniente do suco de uvas da espécie *Vitis labrusca*, cepa da variedade Izabel, da safra 2008/2009. Subproduto doado por Produtos Alimentícios Superbom Indústria e Comércio Ltda.

A bebida foi produzida pela Food Intelligence - Consultoria Técnica em Alimentos S/S Ltda (São Paulo, SP) a partir de farinha de bagaço de suco de uva (FBSU) (Produto com Depósito de pedido de patente de invenção. Farinha de bagaço (casca e semente) de suco de uva e vinho como ingredientes para elaboração de alimentos funcionais, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI/SP, em 2007).

A composição do produto (peso/peso) foi a seguinte: 4,75% de FBSU; 0,08% de goma xantana; 0,02% de sucralose; 0,15% de ácido cítrico e 95,00% de água potável. Composição proximal em base seca: 0,1% de proteínas, 11,0% de lipídios e 82,0% de carboidratos.

A quantidade de fenólicos totais em 300 mL de suco é de 195 mg/Equivalentes de Ácido Gálico (EAG).

3.3 OBTENÇÃO DO SANGUE, SORO, PLASMA, ERITRÓCITOS E LDL

Coletou-se 30 mL de sangue dos indivíduos em jejum de 12 horas no primeiro dia da intervenção do estudo (depois do *washout* e antes do consumo das bebidas de uva) e após quatorze dias do primeiro período de intervenção. O mesmo protocolo se repetiu depois do segundo *washout*. A coleta foi realizada por profissional qualificado terceirizado no Centro de Saúde Paula Souza (FSP-

USP). Materiais descartáveis foram utilizados e descartados em embalagens específicas (caixa para material perfurante e infectante), de acordo com procedimento padrão do próprio local.

Amostras de 4 mL de sangue foram coletadas pelo sistema *vacutainer* seco para análise de lipídios plasmáticos e proteína C-reativa. O material foi imediatamente centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos. O soro foi encaminhado para o Laboratório do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (USP).

A amostra restante do sangue venoso foi coletada em tubos *Vacutainer* contendo EDTA e, imediatamente centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos. O plasma foi separado, identificado e armazenado à -80 °C. Adicionou-se 5 mL de solução salina à papa de eritrócitos, centrifugou-a a 1500g por 15 minutos, à 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento duas vezes. Os eritrócitos lavados foram identificados e armazenados à -80 °C.

Ao plasma destinado a obtenção da lipoproteína LDL, logo após sua separação, foram adicionados os seguintes conservantes ($\mu\text{L/mL}$ de plasma): 20 μL de gentamicina (0,5%) + estreptomicina (0,25%), 5 μL de benzamidina (2mM), 5 μL de aprotinina (0,5%) e 0,5 μL de PMFS (fluoreto de fenil metila sulfonila) diluído em 30 mM de DMSO (dimetilsulfóxido).

A fração LDL do plasma das voluntárias foi isolada por ultracentrifugação sequencial, em ultracentrífuga Sorvall WX 90. A lipoproteína foi dialisada contra solução de tampão fosfato (PBS), contendo EDTA, pH = 7,4 por 8 horas, com uma troca de tampão no intervalo de 4 h. Após esse período, estas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram deixadas *overnight* em diálise contra tampão PBS sem EDTA.

3.4 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO

As concentrações de colesterol total e triglicérides foram determinadas por métodos colorimétricos enzimáticos; HDL-c, pelo ensaio colorimétrico enzimático homogêneo, por precipitação com sulfato de magnésio e sulfato de

dextrano. Para estas dosagens bioquímicas utilizou-se *kits* enzimáticos da marca ROCHE (Roche Diagnostics, Indiana, USA) de modo automatizado, em equipamento Cobas Integra 700. As concentrações de LDL-c e VLDL-c foram determinadas por diferença, utilizando-se a equação de Friedewald * (SBC 2001):

$$\text{LDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C} - \text{TG}/5$$

* (válida se TG < 400mg/dL).

As análises foram realizadas em laboratório terceirizado especializado do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (USP), sob o protocolo PR 642.

3.5 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

3.5.1 Proteína C reativa

Concentrações de Proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR) foram determinadas por método de nefelometria, em equipamento BN II, Dade Behring/ Siemens, com valor de referência 0 a 5 mg/dL no Laboratório do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (USP), sob o protocolo PR 642. O método nefelométrico mede a aglutinação das partículas recobertas por anticorpos pela intensidade da luz refletida (RIFAI et al., 1999).

3.5.2 Citocinas

Interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) foram determinados por *kit* Milliplex da Millipore (Código HCVD3-67CK) em aparelho Luminex, pelo Instituto Genese de Análises Científicas, São Paulo,SP.

Os *kits* Milliplex foram desenvolvidos com microesferas de látex coradas com fluoróforos e se fundamentam no imunoensaio. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das

microesferas, a detecção final é feita por meio de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado por microesferas. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera (GENESE, 2010).

3.6 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A quantificação dos produtos de oxidação foi realizada pela Formação de Dienos conjugados logo em seguida às diálises das partículas de LDL.

A cinética da oxidação da lipoproteína LDL foi monitorada pela medida da formação de dienos conjugados, com o aumento na absorbância a 234 nm no equipamento Shimadzu modelo UV-1650PC. Adicionou-se 1 mL de CuSO_4 (25 $\mu\text{mol/L}$) a alíquotas de LDL contendo 100 μL de proteína e tampão PBS (padronização de volume). A absorbância foi lida em intervalos de 3 minutos por até 3 horas a 37 °C. Calculou-se o tempo (minutos) de resistência das LDL à oxidação (*lag time*) entre o início da reação e a inserção do tempo com a reta extrapolada da fase de propagação. O *lag time* de oxidação das LDL representa o tempo em que essas lipoproteínas resistem à oxidação. Ele é determinado pelo ponto onde o incremento linear da absorbância cruza com a linha do tempo. Quanto maior o *lag time*, maior é o tempo que essas LDL resistem à oxidação. A forma de apresentação dos resultados foi por meio da *fase lag* (JILIAL et al, 1997; MURSU et al, 2005).

3.7 ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

3.7.1 Hemoglobina nos eritrócitos

O *kit* comercial Labtest foi utilizado para quantificar hemoglobina nos eritrócitos pelo método colorimétrico com reagente de cor estoque. O Fe (II) do

grupo heme da hemoglobina é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN), o qual é lido em $\lambda=540$ nm. Amostras e padrão foram lidos em Espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-1650 da Shimadzu – Japão com célula de quartzo de 10 mm termostatizada.

3.7.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi medida nos eritrócitos usando-se *kit* da Randox (SD 125). O princípio do método baseia-se no emprego de xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido, os quais irão reagir com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (I.N.T.) para formar o composto vermelho de formazan. Quanto menor a absorbância obtida, maior o consumo de O_2^- , o que é proporcional à atividade da enzima (McCORD e FRIDOVICH, 1969).

As quantidades de reagentes do *kit* foram adaptadas para microplaca e as leituras realizadas em leitor de microplacas (Molecular Devices – Modelo SpectraMax M5). Os resultados expressos em unidades de SOD/g de hemoglobina.

3.7.3 Glutathiona peroxidase (GSH-Px)

Utilizou-se *kit* Randox (RS 505) para analisar a concentração da glutathiona peroxidase nos eritrócitos. O método refere-se à técnica proposta por PLAGIA e VALENTINE (1967). A GSH-Px catalisa a oxidação da glutathiona (GSH) pelo hidroperóxido de cumeno. Na presença de glutathiona redutase (GR) e NADPH, a glutathiona oxidada (GSSG) é convertida para a forma reduzida, com a concomitante oxidação de NADPH a $NADP^+$. O decréscimo da absorbância é lido a 340 nm.

As quantidades de reagentes do *kit* foram adaptadas para microplaca e as leituras realizadas em leitor de microplacas (Molecular Devices – Modelo

SpectraMax M5). Os resultados expressos em unidades de GSH-Px/g de hemoglobina.

3.7.4 Catalase (CAT)

A atividade desta enzima foi determinada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-1650 da Shimadzu – Japão com célula de quartzo de 10 mm termostatizada) de acordo com o método descrito por AEBI (1984). Foi medida a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em comprimento de onda de 240 nm. O meio de reação continha solução de peróxido de hidrogênio 30 mmol/L em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L pH 7,0. A reação é iniciada pela adição da amostra e acompanhada por 5 minutos a 37 °C. A unidade da catalase foi expressa em mmol/min por miligrama de hemoglobina.

3.8 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA

3.8.1 Capacidade antioxidante total do plasma (TAS)

A TAS foi mensurada analiticamente utilizando-se o *kit Total Antioxidant Status* (TAS - NX2332) da Randox Laboratories Ltd. (UK), adaptado para aparelho leitor de microplacas (Molecular Devices – Modelo SpectraMax M5).

A incubação do 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] ou ABTS[®] com a enzima metahemoglobina peroxidase e peróxido de hidrogênio produz o radical ABTS⁺. Este apresenta coloração verde-azulada estável, sendo medido por espectrofotometria a 600 nm. A presença de antioxidantes na amostra diminui essa coloração de modo proporcional à concentração de antioxidantes presentes na mesma (MILLER et al., 1993).

Utilizou-se as fórmulas abaixo para cálculo da TAS:

$$\text{Fator} = \text{concentração do Padrão} / (\Delta A_{\text{branco}} - \Delta A_{\text{padrão}})$$

O ΔA obtido para o branco da reação foi subtraído do valor obtido para as amostras, aplicando-se a seguinte equação: $TAS \text{ (mmol/L)} = \text{Fator} \times (\Delta A_{\text{branco}} - \Delta A_{\text{amostra}})$

3.8.2 Teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical (ORAC)

O método ORAC mede a capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de protegerem a Fluoresceína (FL) do radical AAPH. A habilidade antioxidante da amostra é calculada a partir da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência (*Area Under the Fluorescence Decay Curve* – AUC), com emissão a 515 nm e excitação a 493 nm. O teste combina o tempo de inibição e a percentagem (%) de inibição da ação do radical pelo antioxidante e usa a área sob a curva para a quantificação (HUANG et al., 2005).

Nesse estudo, o branco foi preparado com 50 μL de tampão fosfato, 150 μL de FL (82,9 nmol/L) e 50 μL de AAPH (221,0 mmol/L). A AUC foi calculada após 60 minutos de leitura, em intervalos de 5 minutos, na temperatura de 37 °C, no aparelho leitor de microplacas (Molecular Devices – Modelo SpectraMax M5). As amostras foram analisadas utilizando as mesmas soluções, entretanto, o tampão fosfato foi substituído por plasma diluído. Para a comparação dos resultados, uma curva com diferentes concentrações (2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μM) do padrão trolox foi feita.

Os resultados foram expressos como equivalentes de μM de trolox.

3.9 ENSAIO COMETA

A fim de avaliar a ação protetora/antioxidante de compostos naturais e sintéticos, diversos trabalhos mostram que o *comet assay* (single-cell gel electrophoresis) é um método simples, sensível e reprodutível para a avaliação de efeitos antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Através deste é possível detectar quebras em fitas simples e duplas e oxidação em bases do DNA (8-OHdG) (MITCHELL e COLLINS, 1999).

A avaliação dos danos oxidativos ao DNA de linfócitos foi feita pelo método *comet assay* (ensaio cometa). A análise de dados foi realizada de acordo com o POOL-ZOBEL et al. (1994). Resumidamente, 4 mL de sangue foram cuidadosamente colocados sobre 4 mL de HISTOPAQUE-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e centrifugados a 400 g a 20 °C por 30 minutos. Após descartar o plasma, os linfócitos foram transferidos para um novo tubo, lavados com 4 mL de solução de Hank's (HBSS, Invitrogen, Carsbad, CA, USA) e centrifugados 100 g a 20 °C por 15 minutos. Descartado o sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 500 µL de Hank's. Alíquotas foram retiradas para que a viabilidade celular fosse avaliada, aquelas com viabilidade inferior a 75% foram descartadas.

A fim de avaliar o possível efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA, 200 µL da suspensão de linfócitos foram mergulhados em uma solução de PBS a 37 °C por 1 hora.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com SINGH et al. (1988). Dez µL da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0,5% (Promega), postos sobre uma lâmina e cobertos com uma lamínula. Estas foram imersas em uma solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4 °C *overnight*. Este procedimento removeu o citoplasma e a maior parte das proteínas nucleares, deixando o DNA *supercoiled* em um formato nucleóide. A presença de quebras no DNA relaxa a espiralização do DNA e a subsequente eletroforese alcalina relaxa ainda mais as alças do DNA, que ficam, após a eletroforese, com aspecto de um cometa. O tamanho da cauda de cometa reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA, e pode ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional.

Após a lise, as lâminas foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH ~ 13,4) por 40 minutos a 4 °C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4 °C por 30 minutos a 25V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com *SYBR Safe*TM

(Invitrogen) e observadas em microscópio de fluorescência. Cem células foram aleatoriamente selecionadas (50 de cada réplica) e analisadas usando o *software* Komet 5.5 (Kinetic Imaging, USA).

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco (USF – Bragança Paulista, SP) em parceria com o Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro.

3.10 ANÁLISE DO CONSUMO ALIMENTAR

As voluntárias foram orientadas a preencher Diário Alimentar de três dias sendo dois dias de dieta habitual (dias da semana) e um dia não usual (final de semana). Essas informações foram avaliadas utilizando-se o software Nutwin – Programa de Apoio à Nutrição®, UNIFESP, 2010 – nos dois momentos de intervenção (bebida à base de FBSU e controle) e no *washout* entre os dois períodos.

3.11 - ANÁLISE DOS DADOS

Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão e foram armazenados pelo programa Microsoft Excel, versão 2000.

Realizou-se o teste *t* de Student pareado (*software Statistical Package for the Social Sciences* SPSS- versão 14.0 for Windows) para avaliar a significância da diferença entre os resultados das diversas análises antes e após o consumo da bebida à base de FBSU e do suco comercial de uva. O nível de significância estabelecido foi de $\alpha = 5\%$.

Dados sobre o consumo alimentar foram analisados (*software Statistical Package for the Social Sciences* SPSS- versão 14.0 for Windows) nos três momentos distintos utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmo neperiano (ln) e o teste reaplicado.

4 RESULTADOS

Quinze voluntárias do sexo feminino, com idade média de $25,4 \pm 2,1$ anos, IMC $22,7 \pm 2,0$ kg/m² concluíram o estudo. O nível de atividade física das voluntárias era de 20% inativas, 40% tinham atividade de intensidade leve e 40% atividade moderada. Não fizeram uso de medicamentos e/ou suplementos durante o período da pesquisa.

4.1 PERFIL LIPÍDICO

Não foi verificada alteração significativa ($p > 0,05$) nas quantidades de colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c e triglicérides durante o estudo (tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do perfil lipídico das 15 voluntárias antes e após a intervenção.

Variáveis (mg/dL)	Bebida FBSU		Controle	
	Basal	Após 2 semanas	Basal	Após 2 semanas
Colesterol total	$174,3 \pm 28,3$	$167,7 \pm 27,3$	$173,7 \pm 40,0$	$175,6 \pm 33,2$
LDL colesterol	$91,0 \pm 28,0$	$85,7 \pm 26,9$	$89,9 \pm 92,4$	$92,4 \pm 29,3$
HDL colesterol	$62,8 \pm 16,1$	$61,0 \pm 14,6$	$63,3 \pm 13,0$	$65,3 \pm 16,9$
VLDL colesterol	$20,5 \pm 7,2$	$20,3 \pm 8,0$	$20,5 \pm 9,5^1$	$17,9 \pm 7,1^1$
Triglicérides	$101,9 \pm 35,3$	$101,7 \pm 40,1$	$102,5 \pm 46,9$	$90,3 \pm 35,9$

LDL – Lipoproteína de baixa densidade; HDL – Lipoproteína de alta densidade; VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

¹Dados analisados como logaritmo neperiano (ln) das médias

4.2 – MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Os valores basais de PCR, IL-6, TNF- α e MCP-1 não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) dos valores após a intervenção, tanto depois das voluntárias ingerirem suco de uva comercial quanto após ingestão da bebida de FBSU (tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos marcadores inflamatórios das 15 voluntárias antes e após a intervenção.

Variáveis	Bebida FBSU		Controle	
	Basal	Após 2 semanas	Basal	Após 2 semanas
PCR (mg/L)	3,79 $\pm$ 5,3	15,97 $\pm$ 44,83	3,01 $\pm$ 4,8	3,00 $\pm$ 3,5
IL-6 (pg/mL)	1,84 $\pm$ 0,9	1,71 $\pm$ 1,0	1,55 $\pm$ 0,5	1,60 $\pm$ 0,9
TNF- α (pg/mL)	1,65 $\pm$ 1,0 ¹	1,84 $\pm$ 1,2 ¹	1,74 $\pm$ 0,6	1,60 $\pm$ 1,1
MCP-1 (pg/mL)	62,70 $\pm$ 16,0	60,30 $\pm$ 15,4	64,75 $\pm$ 21,0	62,83 $\pm$ 15,9

PCR – Proteína C reativa; IL-6 – Interleucina-6; TNF- α – Fator de necrose tumoral; MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos

¹Dados analisados como logaritmo neperiano (ln) das médias

4.3 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A formação de dienos conjugados foi analisada pela oxidação do plasma de cinco voluntárias e expressos pela *fase Lag*. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) dos resultados nos distintos momentos (tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do *lag time* (minutos) de oxidação do plasma (Dienos conjugados) de 5 voluntárias antes e após a intervenção.

Intervenção	<i>Lag time</i> (minutos)	
	Basal	Após 2 semanas
Bebida FBSU	29,6 $\pm$ 5,3	32,4 $\pm$ 3,6
Controle	32,6 $\pm$ 3,8	33,4 $\pm$ 2,1

4.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT não diferiu significativamente em ambos os grupos, intervenção com bebida de FBSU e controle com suco de uva comercial (tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) das enzimas antioxidantes presentes nos eritrócitos das 15 voluntárias antes e após a intervenção.

Variáveis	Bebida FBSU		Controle	
	Basal	Após 2 semanas	Basal	Após 2 semanas
SOD (U/g Hb)	1066,0 $\pm$ 160,6	1068,2 $\pm$ 207,5	1126,4 $\pm$ 216,0	1108,7 $\pm$ 218,9
GSH-Px (U/g Hb)	21,0 $\pm$ 4,1	19,6 $\pm$ 5,1	21,3 $\pm$ 3,8	20,0 $\pm$ 4,9
CAT (UI/mg Hb)	12,9 $\pm$ 1,6	12,3 $\pm$ 2,2	12,8 $\pm$ 2,2	12,4 $\pm$ 1,4

SOD – Superóxido dismutase; GSH-Px – Glutathione peroxidase; CAT – Catalase

4.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA

Conforme mostra a tabela 5, não houve alteração significativa ($p > 0,05$) na capacidade antioxidante total do plasma das voluntárias nos períodos estudados.

Tabela 5 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da capacidade antioxidante total (TAS) do plasma das 15 voluntárias antes e após a intervenção.

Intervenção	TAS (mmol/L)	
	Basal	Após 2 semanas
FBSU	1,37 $\pm$ 0,13	1,36 $\pm$ 0,18
Controle	1,38 $\pm$ 0,14	1,45 $\pm$ 0,19

A ingestão da bebida de FBSU aumentou significativamente ($p < 0,05$) a capacidade antioxidante do plasma das voluntárias segundo o teste ORAC. Resultados do mesmo teste indicam que o suco comercial não alterou

estatisticamente ($p>0,05$) a capacidade antioxidante do plasma das mesmas (tabela 6).

Tabela 6 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical (ORAC) no plasma das 15 voluntárias antes e após a intervenção.

Intervenção	ORAC (equivalentes de mM de trolox)	
	Basal	Após 2 semanas
FBSU	8326,0 $\pm$ 3486,4 ^a	9904,0 $\pm$ 2606,3 ^b
Controle	9278,8 $\pm$ 2210,0 ^a	9071,0 $\pm$ 2217,2 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

4.6 ENSAIO COMETA

A ingestão da bebida de FBSU diminuiu os danos ao DNA de linfócitos das voluntárias, enquanto o consumo do suco comercial não interferiu. Esses resultados podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do efeito da intervenção com bebida de FBSU e com suco comercial de uva nos níveis de danos oxidativos ao DNA.

Intervenção	<i>Tail moment</i> (TM)	
	Basal	Após 2 semanas
FBSU	1,22 $\pm$ 0,29 ^b	1,04 $\pm$ 0,19 ^a
Controle	1,25 $\pm$ 0,29 ^b	1,26 $\pm$ 0,14 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

4.7 CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar foi, em média, igual durante todo período do estudo. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os distintos momentos (tabela 8)

Tabela 8 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do diário alimentar de três dias das 15 voluntárias durante os momentos de consumo da bebida à base de FBSU, suco de uva comercial e *washout*.

	Momentos		
	FBSU	Controle	Washout
Energia (Kcal) ¹	1739,81 $\pm$ 332,26	1818,19 $\pm$ 485,76	1666,97 $\pm$ 294,39
Proteína (g) ¹	73,46 $\pm$ 14,49	72,26 $\pm$ 17,89	72,24 $\pm$ 17,95
Lipídios (g)	56,43 $\pm$ 12,97	62,48 $\pm$ 19,60	56,32 $\pm$ 9,58
Carboidratos (g)	234,72 $\pm$ 54,53	237,69 $\pm$ 48,00	216,61 $\pm$ 44,94
Fibras totais(g)	18,35 $\pm$ 5,73	19,06 $\pm$ 5,78	18,79 $\pm$ 6,64
Ácidos graxos saturados (g) ¹	17,72 $\pm$ 4,72	20,18 $\pm$ 7,11	21,19 $\pm$ 12,88
Ácidos graxos monoinsaturados (g) ¹	13,57 $\pm$ 4,67	16,21 $\pm$ 7,64	16,25 $\pm$ 3,63
Ácidos graxos polinsaturados (g) ¹	7,64 $\pm$ 3,24	7,80 $\pm$ 2,88	7,84 $\pm$ 2,38
Frutas (Kcal) ¹	131,05 $\pm$ 70,33	141,66 $\pm$ 64,89	140,35 $\pm$ 72,07
Hortaliças (Kcal) ¹	37,88 $\pm$ 26,39	53,53 $\pm$ 42,93	52,97 $\pm$ 60,70
FLV (Kcal)	168,93 $\pm$ 79,98	195,19 $\pm$ 90,14	193,32 $\pm$ 111,08

¹Dados analisados como logaritmo neperiano (ln) das médias

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares de uma nova bebida desenvolvida com subproduto da produção de suco de uva em quinze mulheres saudáveis. As voluntárias foram separadas em dois grupos, um grupo iniciou o estudo ingerindo a bebida de FBSU e outro, suco de uva comercial de baixa caloria. A bebida FBSU e o suco comercial de uva são isocalóricos. Após *washout* de duas semanas, inverteu-se a ordem de ingestão das bebidas.

ISHIMOTO (2007) pesquisou a mesma matéria-prima do presente estudo. A autora ofereceu a hamsters hipercolesterolemizados, por 30 dias, dietas com 20% de farinha de bagaço de suco de uva, variedade Isabel ou extrato da mesma farinha contendo 10,4 mg de polifenóis/Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/100 g de peso do animal e comparou os resultados com um grupo controle (dieta normolipidêmica) e um grupo hipercolesterolêmico. Os valores de colesterol total (109,5 mg/dL) e triglicérides (79,5 mg/dL) dos dois grupos tratados com subprodutos da uva foram inferiores aos valores encontrados no grupo hipercolesterolêmico (160,8 mg/dL e 189,9 mg/dL para colesterol total e triglicérides, respectivamente) e similares ao controle (94,8 mg/dL de colesterol e 81,2 mg/dL de triglicérides). Somente o grupo que recebeu dieta com farinha de bagaço de uva apresentou HDL-c semelhante ao grupo controle.

Outros pesquisadores que também estudaram o efeito de compostos bioativos da uva, como as epicatequinas, em modelo animal encontraram resultados semelhantes (CHAN et al., 1999; ZERN et al., 2003; DEL BAS et al., 2005). Assim, ISHIMOTO (2007) concluiu que os dados do seu estudo apoiam a hipótese de que os compostos bioativos presentes em uvas, particularmente uvas tintas, são efetivos na melhora do perfil lipídico em sistemas biológicos.

CASTILLA et al. (2006) estudaram o efeito da suplementação dietética com suco de uva tinta concentrado, por 14 dias, em pacientes recebendo hemodiálise e em um grupo de indivíduos saudáveis. Após este período observaram aumento da HDL-c e diminuição da concentração de colesterol total, LDL-c e do biomarcador inflamatório MCP-1 em ambos os grupos. Os pesquisadores atribuíram esses resultados a composição e a alta concentração de polifenóis do suco oferecido (644 mg/EAG/dia), concluindo que a inibição da absorção intestinal do colesterol e o *clearance* acelerado do LDL plasmático esclarecem a ação hipolipidêmica observada.

O efeito de produtos de uva ricos em fibra dietética e antioxidantes naturais sobre fatores de risco de doenças cardiovasculares em indivíduos normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos foi pesquisado por PÉREZ-JIMÉNEZ et al. (2008). Colesterol total, LDL-c e triglicérides diminuíram significativamente em sujeitos hipercolesterolêmicos, mas não alteraram nos

normocolesterolêmicos. Estes resultados foram atribuídos a associação da fibra dietética com os antioxidantes naturais. Acredita-se que o principal mecanismo hipocolesterolêmico da fibra dietética seja a redução da absorção de triglicérides no intestino grosso, aumento da síntese e excreção de ácidos biliares, inibição da síntese de colesterol pelos ácidos graxos de cadeia curta gerados durante a fermentação e modificação do metabolismo de lipoproteínas por meio do aumento de receptores hepáticos de LDL (EVERSSON et al, 1992; GELISSEN et al, 1994; PÉREZ-OLLEROS et al, 1999; FUKUSHINA et al, 2000; GALISTEO et al, 2005).

Não foi observada diferença significativa no perfil lipídico entre adultos saudáveis recebendo dietas rica ou pobre em antioxidantes por duas semanas, num estudo *crossover* conduzido por VALTUEÑA et al. (2008). A duração do tratamento pode ter sido o suficiente para modificações plasmáticas de moléculas antioxidantes simples, mas não o bastante para uma modificação substancial no balanço antioxidante total. No entanto, estes pesquisadores observaram diminuição da PCR e enzimas hepáticas nos indivíduos que consumiram dieta rica em antioxidantes quando comparados aqueles que receberam dieta pobre, o que indica que uma dieta naturalmente rica em antioxidantes pode trazer benefícios à saúde (VALTUEÑA et al., 2008).

Em outro estudo *crossover*, duplo-cego conduzido por Van MIERLO et al. (2010) com homens saudáveis que ingeriram cápsulas com 800 mg de polifenóis extraídos de uva por duas semanas e placebo pelo mesmo período, separado por uma semana de *washout*, os pesquisadores não observaram diferença na concentração plasmática de colesterol total, LDL-c e HDL-c depois do tratamento quando comparado ao placebo. Estes autores concluíram que o estudo não corrobora com a hipótese de que os compostos fenólicos da uva possuem importante potencial na melhora de marcadores cardiovasculares na população saudável. KARLSEN et al. (2007) notaram que a ingestão diária de 150 mL de vinho tinto por três semanas não afetou uma ampla gama de marcadores inflamatórios, entre eles IL-6, TNF- α e MCP-1, em um estudo de com adultos saudáveis.

No presente trabalho, a ingestão de bebida à base FBSU, durante duas semanas, não influenciou o perfil lipídico e os marcadores inflamatórios PCR, IL-6, TNF- α e MCP-1 em mulheres saudáveis. Alguns estudos em humanos encontraram efeitos positivos dos produtos da uva no perfil lipídico e no sistema inflamatório, no entanto, as evidências não são consistentes (PERÉZ-JIMENEZ e SAURA-CALIXTO, 2008; DOHADWALA e VITA, 2009).

Os polifenóis da uva possuem a capacidade de inibir a oxidação da LDL, propriedade de grande importância, tendo vista que é forte a hipótese de que a oxidação da LDL é o primeiro fator no desenvolvimento da aterosclerose (DIAZ et al. 1997; DOHADWALA e VITA 2009). Porém, segundo DOHADWALA e VITA (2009), na literatura pesquisada não foi encontrado estudos que mostrem a relação entre consumo de polifenóis e redução de aterosclerose em humanos e que é preciso determinar se a inibição da oxidação da LDL é um mecanismo clinicamente relevante.

A suscetibilidade das LDL-c à oxidação foi determinada pelo tempo de resistência destas lipoproteínas à oxidação (*lag time*). A diferença no *lag time* de oxidação das LDL-c das voluntárias antes e após a intervenção não foi significativa em ambos os grupos. Ao contrário deste estudo, MATSUMOTO (2009) encontrou que o *lag time* de voluntárias saudáveis aumentou significativamente após uma hora e após uma semana de consumo de 300 mL/dia de chá mate (1875 mg de fenólicos totais). Comportamento semelhante foi observado por NATELA et al. (2007) que verificaram que o consumo de 200 mL de café influenciou significativamente a resistência da LDL à oxidação por cobre, estendendo o *lag time* de formação de dienos conjugados de indivíduos saudáveis, após 30 e 60 minutos de consumo.

A peroxidação lipídica mediada por radicais livres pode levar a perda da integridade das membranas celulares e a danos teciduais. A inativação e remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) dependerão da capacidade de defesa antioxidante de um sistema determinado por uma interação dinâmica entre enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, EC 1.15.1.1, glutathione peroxidase - GSH-Px, EC 1.11.1.9, catalase - CAT, EC 1.11.1.6, glutathione reductase - GR, EC 1.6.4.2), e os antioxidantes não enzimáticos que

incluem moléculas de baixo peso molecular, tais como tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno, glutathiona - GSH e ácido úrico (KREPA et al., 2008).

Considerando-se a importância do sistema endógeno de defesa antioxidante, e o fato dos ácidos fenólicos alterarem a expressão de SOD, GSH-Px e CAT (YEH e YEN, 2006), avaliou-se neste estudo a atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT nos eritrócitos das voluntárias antes e depois do consumo das bebidas. As diferenças encontradas não foram significantes estatisticamente. Estes resultados corroboram com os observados por KREPA et al. (2008), em homens jovens saudáveis após a ingestão de extrato de casca de uva tinta por 6 semanas. DUTHIE et al. (2006) avaliando o efeito de suco de *cranberry* em mulheres saudáveis, também não encontraram diferença significativa nas enzimas SOD e CAT.

Uvas e vinho tinto são ricos em fenólicos, substâncias com forte potencial para aumentar a capacidade antioxidante do plasma em humanos (KREPA et al., 2008). A capacidade antioxidante do plasma das mulheres que participaram do nosso estudo foi avaliada por dois métodos: TAS e ORAC. O potencial antioxidante de suco rico em polifénóis em soro de indivíduos saudáveis antes e depois de uma, duas, quatro e seis horas de ingestão, foi analisado por GARCIA-ALONSO et al. (2006), utilizando o método do poder redutor do ferro (FRAP). A diferença encontrada não foi significativa estatisticamente. KARLSEN et al. (2007) também não verificaram diferença após três semanas de consumo de vinho por indivíduos saudáveis pelo teste FRAP. Já PECORARI et al. (2010) mostraram aumento significativo no poder redutor do plasma de voluntários saudáveis depois de 0,5; 1; 2 e 4 horas da ingestão de chá verde, o que levou os autores a concluir que o consumo de chá verde é uma fonte dietética de antioxidantes capaz de prevenir o estresse oxidativo.

MICALLEF et al. (2007) suplementaram voluntários saudáveis com vinho tinto (400 mL/dia) durante quatorze dias. A capacidade antioxidante avaliada pelo teste TAS foi 7 e 16% maior nos jovens e idosos, respectivamente. Esta elevação confirma a evidência de que a menor incidência de doenças

cardiovasculares em populações que consomem vinho tinto regularmente é devido ao aumento da proteção na circulação à oxidação. Sugere também que duas semanas são suficientes para os benefícios do consumo de vinho tinto (MICALLEF et al., 2007).

Embora a capacidade antioxidante medida por TAS do plasma das participantes do presente estudo não tenha diferido estatisticamente antes e após as intervenções, pelo teste ORAC, a mesma foi significativamente maior depois de 14 dias ingerindo a bebida de FBSU. No período em que as voluntárias estavam consumindo o suco de uva comercial não houve alteração significativa. A diminuição do estresse oxidativo e aumento da capacidade antioxidante do plasma são importantes na prevenção de doenças cardiovasculares (MICALLEF et al., 2007).

Neste trabalho, o ensaio cometa (*comet assay*) mostrou que houve proteção ao DNA dos linfócitos após o consumo da bebida de FBSU. A ingestão do suco comercial de uva não alterou os níveis de danos ao DNA. Alguns estudos corroboram com estes resultados. PARK et al. (2003) suplementaram adultos saudáveis com suco de uva por oito semanas e observaram redução de dano ao DNA de linfócitos. Indivíduos saudáveis que consumiram suco de frutas vermelhas por quatro semanas apresentaram diminuição de dano ao DNA, enquanto a ingestão de suco controle não alterou o nível de dano (WEISEL et al., 2006). Em 2009, PARK et al. suplementaram outro grupo de adultos com suco de uva, em um estudo duplo cego e chegaram a mesma resposta, redução de dano ao DNA no grupo caso e não encontraram diferença no grupo controle. Possivelmente os compostos fenólicos contidos nos produtos de uva exercem efeito protetor em linfócitos, protegendo-os de danos ao DNA devido ao decréscimo de radicais livres (PARK et al., 2003).

A dieta habitual dos indivíduos foi verificada por meio de três diários alimentares de três dias, sendo dois dias de dieta habitual (dias da semana) e um dia de dieta especial (final de semana). A análise destes diários indicou que além da alimentação dos indivíduos não ter sido alterada durante o estudo ($p>0,05$), o consumo calórico destes estava dentro de uma recomendação saudável para adultos que precisam manter ou perder peso (aproximadamente 1500 Kcal/dia).

Com exceção de fibra alimentar, que o consumo foi abaixo do recomendado (25-30g/dia), de proteínas (16,7%) e de ácidos graxos saturados (10,2%) valores acima dos recomendados (15 e 7%, respectivamente), os outros nutrientes foram consumidos de acordo com as recomendações da IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose (SBC, 2007). Esta avaliação do consumo alimentar das voluntárias indica que a dieta não deve ter influenciado nos resultados do estudo.

Algumas explicações possíveis para a bebida de FBSU não ter influenciado o perfil lipídico, os biomarcadores inflamatórios PCR, IL-6, TNF- α e MCP-1, *lag time* da oxidação da LDL, enzimas antioxidantes e TAS são a quantidade de compostos fenólicos da bebida (195 mg/EAG/dia) e o tempo de intervenção que podem ter sido insuficientes. Embora estudos afirmem efeitos benéficos à saúde por compostos fenólicos no período de duas semanas (CASTILLA et al., 2006; KARATZI et al., 2007; MICALLEF et al., 2007).

Ao avaliar a capacidade antioxidante do plasma das voluntárias pelo ORAC, a bebida de FBSU desenvolvida neste projeto, sinalizou ter efeitos benéficos em mulheres saudáveis. Há forte evidência epidemiológica de que o consumo de uvas e outros alimentos ricos em polifenóis reduzem o risco de doenças cardiovasculares (DOHADWALA e VITA, 2009).

6 CONCLUSÃO

A quantidade de 300 mL/ dia da bebida de FBSU por 14 dias aumentou a capacidade antioxidante total do plasma medida por ORAC e reduziu danos oxidativos no DNA dos linfócitos das voluntárias, indicando ser um alimento com potencial na prevenção e/ou redução do estresse oxidativo e suas consequências. No entanto, não foi suficiente para alterar a maioria dos parâmetros de balanço redox e biomarcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis.

7 REFERÊNCIAS

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, New York 1984; 105: 121-6.
2. Brasil. Ministério da Saúde. [homepage na internet] Diretrizes e Recomendações para o Cuidado Integral de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis.[acesso em 20/10/2010] Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/volume8livro.pdf>
3. Brasil. Ministério da Saúde. [homepage na internet] Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. [acesso em 13/08/2009] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel_2006_brasil.pdf
4. Castilla P, Echarri R, Dávalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, Lucas MF, Gómez-Coronado D, Ortuñ J, Lasunción M.A. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:252–62.
5. 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.
6. 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 YP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J* 2005;19(3):479-481.
7. Diaz MJ, Madejon E, Lopez F, Lopez R, Cabrera F. Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. *Process Biochemist* 2002; 37:1143–1150.
8. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New Engl J Med* 1997; 337:408–16.
9. Dohadwala MM, Vita JA. Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr*. 2009;139:S1788–93.
10. Duthie SJ, Jenkinson AMcE, Crozier A, Mullen W, Pirie L, Kyle J, Yap LS, Christen P, Duthie GG. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur J Nutr*. 2006; 45:113-122.
11. Eversson GT, Daggy BP, McKinley C, Story JA. Effects of psyllium hydrophilic mucilloid on LDL-cholesterol and bile acid synthesis in hypercholesterolemic men. *J Lipid Res* 1992;33:1183–92.
12. Fukushima M, Nakano M, Morii Y, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K. Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. *J Nutr* 2000;130:2151– 6.

13. Galisteo M, Sanchez M, Vera R, Gonzalez M, Anguera A, Duarte J, et al. A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension and obesity by affecting adipoectin and TNF- α in obese Zucker rats. *J Nutr* 2005; 135:2399–404
14. Garcia-Alonso J, Ros G, Vidal-Guevara ML, Periago MJ. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutr Res.* 2006; 26:330-339.
15. Gelissen JC, Brodie B, Eastwood MA. Effect of *Plantago ovata* (psyllium) husks and seeds on sterol metabolism: studies in normal and ileostomy subjects. *Am J Clin Nutr.* 1994;59:395– 400.
16. Genese [homepage na internet] [acesso em 11/06/2010] Disponível em: www.gendiag.com.br
17. Giehl MR, Bosco SMD, Laflor CM, Weber B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. *Scientia Medica* 2007; 17(3): 145-55.
18. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1841-56.
19. Ishimoto EY. Efeito hipolipemiante de subprodutos da uva em hamsters. [Tese de doutorado] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.
20. Jilial, I.; Devara, J.S. Assessment of LDL oxidation: in vivo and ex vivo measurements . in: aruoma, o.i. & cuppet, s.l. – antioxidant methodology- in vivo and in vitro concepts. illionois: AOCS 1997: 85-99.
21. Karatzi K, Papamichael C, Karatzis E, Papaioannou TG, Voidonikola PT, Lekakis J, Zampelas A. Acute smoking induces endothelial dysfunction in healthy smokers. Is this reversible by red wine's antioxidant constituents? *J Am Coll Nutr.* 2007;26:10–5.
22. Karlsen A, Retterstol L, Laake P, Kjolsrud-Bohn S, Sandvik L, Blomhoff R. Effects of a daily intake of one glass of red wine on biomarkers of antioxidant status, oxidative stress and inflammation in healthy adults. *European J Clin Nutr Metabolism.* 2007; 2:127-133.
23. Krępa ES, Kłapcińska B, Kimsa E, Karpiński R. Effects of supplemetation with red grape skin polyphenolic extract and interval swimming test on the blood antioxidant status in healthy men *Med Sport.* 2008; 12(1): 1-7.
24. Madejon E, Diaz MJ, Lopez R, Cabrera F. Co-composting of sugarbeet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used. *Biores Technol* 2001; 76:275–278.
25. Madejon E, Diaz MJ, Lopez R, Cabrera F. New approaches to establish optimum moisture content for compostable materials. *Biores Technol* 2002; 85:73–78.
26. Matsumoto RLT, Bastos DHM. Effects of Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57:1775–1780.
27. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.

28. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J* 2007; 27(6): 1-8.
29. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993, 84: 407-12.
30. Mitchell JH, Collins AR, Effects of a soy milk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men — a pilot study. *Eur J Nutr.* 1999; 38:143–148.
31. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Helleranta M, Rissanen TH, Nurmi A, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Nyyssönen K, Virtanen JK, Salonen R, Salonen JT. Polyphenol-Rich Phloem Enhances the Resistance of Total Serum Lipids to Oxidation in Men *J Agric Food Chem* 2005; 53:3017-3022.
32. Natella F, Nardini M, Belevi F, Scaccini C. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J clin Nutr.* 2007; 86:604-9.
33. Park YK, Lee SH, Park E, Kim JS, Kang MH. Changes in Antioxidant Status, Blood Pressure, and Lymphocyte DNA Damage from Grape Juice Supplementation. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171:385-390.
34. Park YK, Park E, Kim JS, Kang MH. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res* 2003; 529:77–86.
35. Pecorari M, Villano D, Testa MF, Schmid M, Serafini M. Biomarkers of antioxidant status following ingestion of Green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54:278-83.
36. Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutr Res Rev.* 2008; 21:158–73.
37. Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio E, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutr.* 2008; 24:646-53.
38. Pérez-Olleros L, García-Cuevas M, Ruiz-Roso B. Influence of pulp and natural carob fiber on some aspects of nutritional utilisation and lipidaemia. *Food Sci Tech* 1999; 5:425–30.
39. Plagia DE, Valentine WN. Studies the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-69.
40. Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kucheumeister F, Lambertz R, Leucht U, SchOder HG, Schmezer P. Detection of Genotoxic Effects in Human Gastric and Nasal Mucosa Cells Isolated from Biopsy Samples. *Environm Mol Mut* 1994; 24: 23-45.
41. Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clin Chem* 1999; 45: 2136-41.
42. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175:184-91.

43. Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77: 1-48.
44. Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 88.
45. Valtueña S, Pellegrini N, Franzini L, Bianchi MA, Ardigò D, Del Rio D, Piatti P, Scazzina F, Zavaroni I, Brighenti F. Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:1290-7.
46. Van Mierlo LAJ, Zock PL, Van der Knaap HDM, Draijer R. Grape polyphenols do not affect vascular function in healthy men. *J Nutr*. 2010; doi:10.3945/jn.110.125518.
47. Weisel T, Baum M, Eisenbrand G. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J*. 2006; 1:388-397.
48. Yeh CT, Yen GC. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA Expression. *J Nutr*. 2006; 136:11-15.
49. Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem*. 2004; 52:255-260.
50. 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.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participação na Análise Sensorial

Investigadores: Marcela Piedade Monteiro 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 bebida elaborada a partir de farinha de derivados da uva.

Benefícios: Ao final da pesquisa, pretende-se disponibilizar para a população uma bebida rica em antioxidantes naturais, os quais podem prevenir algumas doenças, tais como doenças cardíacas, vasculares e câncer.

Riscos: A bebida a ser experimentada foi fabricada sob rígido controle de higiene, não oferecendo riscos à saúde. Trata-se de uma farinha com baixa atividade de água que é conservada em freezer a -18°C.

Confiabilidade: Os resultados serão divulgados pela mídia, em eventos e periódicos científicos das áreas de nutrição e ciência e tecnologia de alimentos, sendo mantido total sigilo (anonimato) a respeito da participação dos provadores nesta pesquisa.

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: Marcela Piedade Monteiro, 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: mamonte@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 2009.

Assinatura: _____

Marcela Piedade Monteiro

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

Maiores informações:

PESQUISADORES: Marcela Piedade Monteiro e Profa. Elizabeth AFS Torres – Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715, São Paulo – SP.
Telefones: (11)3061-7748 e/ou (11) 3061-7857.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Assessoria Acadêmica – CEP: 01246-904 – São Paulo – SP
Telefones: (55-11) 3061-7779/ 7742 e-mail:coep@fsp.usp.br site: www.fsp.usp.br

ANEXO 2

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/074/09

PROTOCOLO	1853
PROJETO DE PESQUISA	BEBIDAS À BASE DE SUBPRODUTOS DA UVA: EFEITOS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM HUMANOS
PESQUISADOR(A)	Marcela Piedade Monteiro
ÁREA TEMÁTICA	Grupo III

São Paulo, 18 de Março de 2009.

Prezado(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – COEP *analisou*, em sua **2.ª/09 Sessão Ordinária**, realizada em **13/03/2009**, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - CNS, o protocolo de pesquisa acima intitulado e o considera **APROVADO**.

Cabe lembrar que conforme Resolução CN/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,

Cláudio Leone

Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Assoc. Elizabeth Aparecida F. da Silva Torres
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública

ANEXO 3

Estudo: *Bebida à base de subprodutos de uva: efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de doenças cardiovasculares em humanos.*

IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Nome: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ RG: _____
 Nome da Mãe: _____
 Endereço: _____
 Telefones: _____
 E-mail: _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Data: ____/____/____ Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

QUESTIONÁRIO SOBRE ATIVIDADE FÍSICA

1. Nos últimos três meses, o(a) sr(a) praticou algum tipo de exercício físico ou esporte?

☐ sim ☐ não (pule para q7) (não vale fisioterapia)

2. Qual o tipo principal de exercício físico ou esporte que o(a) sr(a) praticou? ANOTAR APENAS O PRIMEIRO CITADO

☐ caminhada (não vale deslocamento para trabalho)

☐ caminhada em esteira (pule para q4)

☐ corrida (pule para q4)

☐ corrida em esteira (pule para q4)

☐ musculação (pule para q4)

☐ ginástica aeróbica (pule para q4)

☐ hidroginástica (pule para q4)

☐ ginástica em geral (pule para q4)

☐ natação (pule para q4)

☐ artes marciais e luta (pule para q4)

☐ bicicleta (pule para q4)

☐ futebol (pule para q4)

☐ basquetebol (pule para q4)

☐ voleibol (pule para q4)

☐ tênis (pule para q4)

☐ outros (pule para q4)

3. Quando o(a) sr(a) faz caminhada, sua respiração costuma ficar:

☐ igual a de sempre ☐ um pouco aumentada ☐ não sabe

4. O(a) sr(a) pratica o exercício pelo menos uma vez por semana?

☐ sim ☐ não – (pule para q7)

5. Quantos dias por semana o(a) sr(a) costuma praticar esporte ou exercício?

☐ todos os dias

☐ 5 a 6 dias por semana

☐ 3 a 4 dias por semana

☐ 1 a 2 dias por semana

6. No dia que o(a) sr(a) pratica exercício ou esporte, quanto tempo dura esta atividade?

☐ menos que 10 minutos

☐ entre 10 e 19 minutos

☐ entre 20 e 29 minutos

☐ entre 30 e 39 minutos

☐ entre 45 e 59 minutos

☐ 60 minutos ou mais

7. Nos últimos três meses, o(a) sr(a) trabalhou?

☐ sim ☐ não – (pule para q12)

8. No seu trabalho, o(a) sr(a) anda bastante a pé?

☐ sim ☐ não ☐ não sabe

9. No seu trabalho, o(a) sr(a) carrega peso ou faz outra atividade pesada?

☐ sim ☐ não ☐ não sabe

10. O(a) sr(a) costuma ir a pé ou de bicicleta de casa para o trabalho:

☐ sim ☐ não – (pule para q12)

11. Quanto tempo o(a) sr(a) gasta para ir e voltar do trabalho?

☐ menos de 10 minutos

☐ entre 10 e 19 minutos

☐ entre 20 e 29 minutos

☐ entre 30 e 44 minutos

☐ entre 45 e 59 minutos

☐ 60 ou mais minutos

12. Quem costuma fazer a faxina da sua casa?

☐ eu próprio ☐ outra pessoa (pule para q15)

13. O(a) sr(a) costuma ter ajuda para fazer a faxina?

☐ sim ☐ não (pule para q15)

14. A parte mais pesada da faxina fica com:

☐ o(a) sr(a) ou ☐ outra pessoa ☐ ambos

15. O(a) sr(a) costuma assistir televisão todos os dias?

☐ sim (pule para q17) ☐ não

16. Quantos dias por semana o(a) sr(a) costuma assistir televisão?

☐ 5 ou mais

☐ 3 a 4

☐ 1 a 2

☐ não costuma assistir televisão

17. Quantas horas por dia o(a) sr(a) costuma assistir televisão?

☐ menos de 1 hora

☐ entre 1 e 2 horas

☐ entre 2 e 3 horas

☐ entre 3 e 4 horas

☐ entre 4 e 5 horas

☐ entre 5 e 6 horas

☐ mais de 6 horas

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: “Bebida à base de subprodutos da uva: efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de doenças cardiovasculares em humanos”.

Objetivo: Avaliar os efeitos de uma bebida à base de farinha de bagaço de uva (FBU) proveniente da produção de suco de uva sobre parâmetros de indicadores (marcadores) de doenças cardíacas e vasculares em humanos.

A presente pesquisa será desenvolvida no Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública – sob a responsabilidade da Nutricionista Marcela Piedade Monteiro e, sob a orientação da Profa. Dra. Elizabeth AFS Torres.

Foram prestados esclarecimentos sobre todos os procedimentos a serem realizados, eu me submeterei à dieta prescrita (inclusão da ingestão diária de 300 mL de bebida de sub-produtos da uva) durante duas semanas e ingestão de uma bebida similar sem sub-produto de uva por outras duas semanas. Permito a coleta de 30 mL de sangue venoso, antes e ao final de cada suplementação. Estou ciente da importância da pesquisa para estudos de prevenção de algumas doenças, tais como doenças cardíacas, vasculares e câncer.

Também foram esclarecidos os seguintes pontos:

Benefícios: Ao final da pesquisa, pretende-se disponibilizar para a população uma bebida rica em antioxidantes naturais, os quais podem prevenir algumas doenças, tais como doenças cardíacas, vasculares e câncer.

Riscos: As bebidas a serem ingeridas foram fabricadas sob rígidos controles de higiene, não oferecendo riscos à saúde. Trata-se de uma farinha com baixa atividade de água que é conservada em freezer a -180°C. Todo material a ser utilizado na coleta de sangue será descartável, não oferecendo riscos à saúde.

Terei acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive tendo direito de sanar qualquer tipo de dúvida;

A participação é voluntária e a desistência não acarretará qualquer tipo de prejuízo ou desconforto de qualquer espécie;

A pesquisadora se compromete a não identificar o indivíduo e a manter o caráter confidencial das informações relacionadas à sua privacidade.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pela pesquisadora, eu _____ consinto em participar desta pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de 2009.

Assinatura da pesquisadora

assinatura do participante

Maiores informações:

PESQUISADORES: Marcela Piedade Monteiro e Profa. Elizabeth AFS Torres – Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715, São Paulo – SP.
Telefones: (11)3061-7748 e/ou (11) 3061-7857.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Assessoria Acadêmica – CEP: 01246-904 – São Paulo – SP
Telefones: (55-11) 3061-7779/ 7742 e-mail:coep@fsp.usp.br site: www.fsp.usp.br

ANEXO 5

The screenshot displays the Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR) website. The browser address bar shows the URL www.anzctr.org.au/ACTRN12609000824268.aspx. The website header includes the ANZCTR logo and navigation links: Home, Login, Contact us, Feedback, Register Trial, Trial Search, Latest News, FAQ, and About Us.

Trial Details

indicate updates made to monitored data item(s) since trial registration. These data item(s) are monitored to ensure they comply with the WHO / journal editors standards.

[View Trial at Registration](#) [View History](#)

Request Number:	320606
ACTR Number:	ACTRN12609000824268
Trial Status:	Registered
Date Submitted:	15/09/2009
Date Registered:	22/09/2009

Page 1

Public title:	Beverage prepared with grape by-product: effect on oxidative stress and coronary artery disease markers in human beings
ANZCTR registration title:	Effects of ingestion of a beverage prepared with grape by-product on plasma and low density lipoprotein (LDL) to oxidation and on antioxidant status in healthy individuals: a randomized, controlled, crossover clinical trial
Secondary ID:	
UTN:	U1111-1111-8188
Trial acronym:	

Page 2

The taskbar at the bottom shows the Windows 7 interface with open applications including 'Australian New Zealand...' and 'CAPITULO 3[1] Mar...'. The system clock indicates the time is 19:22 on 3/11/2015.

Marcela Piedade Monteiro

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Marcela Piedade Monteiro
Nascimento 13/05/1978 - Itapemerim/ES - Brasil
CPF 03585421628

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007** Doutorado em Nutrição em Saúde Pública.
 Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
 Título: BEBIDAS À BASE DE SUBPRODUTOS DA UVA: EFEITO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM HUMANOS
 Orientador: Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva TORRES
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2002 - 2004** Mestrado em Bioquímica Agrícola.
 Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicoso, Brasil
 Título: Alfa-amilase em frangos de corte: efeitos do balanço eletrolítico e do nível protéico da dieta, Ano de obtenção: 2004
 Orientador: George Henrique Kling de Moraes
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1996 - 2000** Graduação em Nutrição.
 Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, Brasil

Atuação profissional

1. Escola Agrotécnica Federal de Barbacena - EAFB

Vínculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: concurso publico , Enquadramento funcional: professor , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

02/2005 - 07/2005 Outro

Especificação:

Microbiologia e Procedimentos de Análise Microbiológica de Alimentos , Política na Saúde , Planejamento de Refeições , Nutrição Materno-Infantil

2. Universidade Presidente Antônio Carlos - UNIPAC

Vínculo institucional

2005 - 2005 Enquadramento funcional: instrutora de estágio , Carga horária: 20, Regime: Parcial

CURRICULO LATTES
ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES

Concluiu o Doutorado em Ciência dos Alimentos (São Paulo, SP) pela Universidade de São Paulo, em 1988. Foi Visiting Scholar na MSU de 1986 a 1987, como bolsista Fulbright Comissão. Professora Associada - desde 2000 na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Publicou 83 artigos em periódicos especializados e 126 trabalhos em anais de eventos. Possui 4 livros publicados, 1 processo, 1 software e 1 patente técnica além de outros 30 itens de produção técnica. Participou de 11 eventos no exterior e 78 no Brasil. Supervisionou 1 pós-doutor com bolsa da FAPESP e supervisiona um Jovem Pesquisador com auxílio e bolsa da FAPESP. Orientou 22 dissertações de Mestrado, 11 teses de Doutorado e co-orientou 1 tese de Doutorado, em complemento orientou 22 trabalhos de Iniciação Científica nas áreas de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Coletiva. Recebeu 6 Prêmios/Homenagens. Atua diretamente na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em quatro linhas de pesquisa: 1) Lipídios, ácidos graxos, colesterol, fitoesterol e seus produtos de oxidação. 2) Antioxidantes e substâncias bioativas. 3) Carnes, Aves e Pescados 4) Microsossomos, Lipossomos e Sistemas Modelo. Em suas atividades profissionais, interagiu com 165 colaboradores em co-autorias de trabalhos científicos. Em seu CV Lattes, os termos mais frequentes na contextualização da produção científica, tecnológica e artístico cultural, são: aulas ministradas, comissões, grupos de trabalho, valor nutricional, segurança alimentar, lipídios, qualidade higiênico sanitária, substitutos de gordura, alimentos funcionais e tecnologia de alimentos. Em 09/09/2010 apresentou fator H=8 na base SCOPUS.

Última atualização do currículo em 30/09/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/9804923403746874>

Dados Pessoais

Nome em citações bibliográficas TORRES, E. A. F. S.;

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição.

Av. Dr. Arnaldo, 715 HNT

Cerqueira César

01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil

Telefone: (11) 30617857 Fax: (11) 30617130

URL da Homepage: www.fsp.usp.br/~eatorres/