

LUDMILA NOGUEIRA NOVAES

**Efeito do consumo de extrato de frutas ricas em antioxidantes
no estresse oxidativo, perfil hemodinâmico e resistência à
insulina em indivíduos hipertensos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Tamasso Espin Garcia
Caldini

**São Paulo
2019**

LUDMILA NOGUEIRA NOVAES

**Efeito do consumo de extrato de frutas ricas em antioxidantes
no estresse oxidativo, perfil hemodinâmico e resistência à
insulina em indivíduos hipertensos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Tamasso Espin Garcia
Caldini

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Novaes, Ludmila Nogueira

Efeito do consumo de extrato de frutas ricas em antioxidantes no estresse oxidativo, perfil hemodinâmico e resistência à insulina em indivíduos hipertensos / Ludmila Nogueira Novaes. -- São Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Elia Tamaso Espin Garcia Caldini.

Descritores: 1.Antioxidantes 2.Frutas
3.Resistência à insulina 4.Estresse oxidativo
5.Hipertensão 6.Polifenóis

USP/FM/DBD-440/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esse trabalho a Deus por me iluminar em todos os momentos; à minha família e ao meu marido pelo incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me direciona em todos os momentos.

Ao meu marido Renan de Carvalho Gaeta por ser meu incentivador, pelo apoio constante tanto na vida profissional como na vida pessoal a qual passei a ter o privilégio de dividir com ele.

Aos meus pais Maria do Carmo e Eduardo, meu irmão Lucas, toda minha família e amigos pelo incentivo, suporte e torcida constante.

Ao professor Heno Ferreira Lopes por acreditar no meu potencial, por todos os ensinamentos, pela dedicação no meu desenvolvimento científico e por acreditar no meu trabalho.

A professora Maria Claudia Irigoyen por me ajudar em todos os momentos em que precisei, por toda paciência, compreensão e compaixão.

A professora Élia G Caldini por me mostrar com todo cuidado que um professor pode passar muito mais que conteúdo aos seus alunos; por me aceitar como sua orientanda e me orientar sempre.

A Carine Sangaletti por me ensinar sobre avaliação do balanço autonômico, por toda sua paciência, disponibilidade e principalmente por todo incentivo. A Keyla Katayama por me ajudar na coleta dos dados; à professora Katia De Angelis, Sarah Freitas e Ariane Viana pelo auxílio na análise do estresse oxidativo. A Mariele Coral de Moraes pela ajuda na coleta de dados e por acreditar nesse trabalho.

A toda equipe do setor de Nutrição do InCor por compreender meus momentos de ausência, sem esse apoio nada poderia ser realizado.

As minhas amigas e colegas de profissão pelo apoio imprescindível para chegar até aqui, Tamyris Gonçalves, Thaís Leão, Larissa Alves, Mariana D'Ambrósio, Tatiana Gomes e Isabella Fernandes.

A todos da Unidade de Hipertensão, pelo espírito colaborativo, pela agradável convivência, aprendizado e trocas de experiências.

Aos voluntários da pesquisa pela disponibilidade, paciência e adesão.

A FAPESP pelo auxílio financeiro durante a realização do presente trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2 A HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	3
1.3 RESISTÊNCIA A INSULINA.....	6
1.4 O ESTRESSE OXIDATIVO E SEUS MARCADORES	8
1.4.1 Marcadores do dano oxidativo	9
1.4.2 Marcadores da capacidade antioxidante	10
1.5 INTERVENÇÃO NUTRICIONAL COMO PREVENÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR	12
1.6 CARACTERÍSTICAS DO MIRTILO, CRANBERRY E ROMÃ.....	14
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	18
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1 CARACTERÍSTICAS DAS CÁPSULAS	19
3.1.1 Composição	20
3.1.2 Análise da capacidade antioxidante e da concentração de compostos fenólicos nos extratos de frutas	20
3.1.2.1 <u>Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)</u>	21
3.1.2.2 <u>Método de Folin-Ciocalteu: determinação de compostos fenólicos totais</u>	22
3.2. CASUÍSTICA	23
3.3 INTERVENÇÃO	25
3.4. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	26
3.5. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA	27
3.6. ANÁLISES CLÍNICAS	28
3.7. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA	28
3.8. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	30
3.8.1 Medidas de Marcadores do Dano Oxidativo	30
3.8.1.1 <u>Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)</u>	30
3.8.1.2 <u>Dosagem de proteínas carboniladas</u>	31

3.8.2 Medidas de Marcadores da Capacidade Antioxidante	32
3.8.2.1 <i>Determinação da atividade da catalase (CAT)</i>	32
3.8.2.2 <i>Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)</i>	32
3.8.2.3 <i>FRAP - "Ferric Reducing Antioxidant Power"</i>	34
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4. RESULTADOS	36
4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS DE FRUTAS	36
4.2. DADOS DA AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	37
4.3. DADOS DE RESISTÊNCIA À INSULINA.....	38
4.3. DADOS DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	40
4.5. DADOS DOS PARAMETROS HEMODINÂMICOS.....	41
4.6. DADOS DA AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	42
4.6.1. Avaliação dos Marcadores de Dano Oxidativo	42
4.6.2 Avaliação de Marcadores de Capacidade Antioxidante	44
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9. ANEXO.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CC	Circunferência da cintura
CCerv	Circunferência cervical
DASH	<i>Dietary Approaches to Stop Hypertension</i>
DP	Desvio padrão
FC	Frequência cardíaca
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GPx	Glutathiona peroxidase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL-c	<i>High density lipoprotein cholesterol</i>
HF	<i>High frequency</i>
HOMAir	<i>Homeostatic model assessment</i>
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL-c	<i>Low density lipoprotein cholesterol</i>
LF	<i>Low frequency</i>
LF/HF	<i>Ratio of LF-to-HF power</i>
MCP-1	Monócito quimioatraente de proteína-1
ORAC	<i>Absorption Capacity of Oxygen Radicals</i>
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
RMSSD	<i>Root mean square of successive RR interval differences</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDNN	<i>Standard deviation of NN intervals</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
VFC	VFC – Variabilidade da frequência cardíaca

RESUMO

Novaes LN. *Efeito do consumo de extrato de frutas ricas em antioxidantes no estresse oxidativo, perfil hemodinâmico e resistência à insulina em indivíduos hipertensos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Dietas ricas em substâncias antioxidantes (polifenóis) podem reduzir o risco de eventos cardiovasculares. O baixo consumo de frutas e vegetais está envolvido na ocorrência estresse oxidativo, hipertensão e resistência à insulina. Embora o consumo da fruta in natura ou sob a forma de sucos seja a melhor forma de aquisição de seus componentes nutricionais, a cápsula contendo extratos de frutas tem a vantagem de ser facilmente consumida e possuir longa duração. Assim sendo, são necessários estudos que possam embasar a suplementação de antioxidantes sob a forma de frutas encapsuladas e verificar se as propriedades protetivas dessas frutas se mantêm após o processamento que gera os extratos. Assim sendo, os objetivos desse estudo são: 1) Determinar o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos extratos de cranberry, mirtilo e romã; 2) Realizar avaliação de marcadores de estresse oxidativo, marcadores de atividade inflamatória, juntamente com avaliação hemodinâmica. Para tal, realizou-se um ensaio clínico, controlado por placebo, com indivíduos hipertensos e normotensos que receberam as cápsulas de extratos de frutas (blueberry, cranberry e romã) durante 4 semanas. Foram realizadas avaliações hemodinâmicas, dos mediadores inflamatórios, da resistência à insulina e da atividade antioxidativa do plasma. A análise bioquímica dos extratos de frutas mostrou que a atividade antioxidante dos componentes fenólicos se mantêm nas cápsulas. O índice HOMA_{air}, que reflete a resistência à insulina, diminuiu significativamente após o consumo das cápsulas. Embora não tenha havido alterações hemodinâmicas, após o consumo das cápsulas, houve uma diminuição da peroxidação lipídica e um aumento de atividade da catalase. Os resultados desse estudo sugerem que a suplementação com cápsulas de cranberry, mirtilo e romã é capaz de reverter danos oxidativos e reduzir a resistência à insulina em pacientes hipertensos.

Descritores: Antioxidantes; Frutas; Resistência à insulina; Estresse oxidativo; Hipertensão; Polifenóis.

Novaes LN. *Effect of antioxidant-rich fruit extract intake on oxidative stress, hemodynamic profile and insulin resistance in hypertensive patients* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Diets high in antioxidant substances (polyphenols) may reduce the risk of cardiovascular events. Low consumption of fruits and vegetables is involved in oxidative stress, hypertension and insulin resistance. Although the consumption of fresh fruit or juice is the best way to acquire its nutritional components, the use of capsules containing fruit extracts has the advantage of being easily consumed and lasting longer. Therefore, studies are needed to support antioxidant supplementation in the form of encapsulated fruit extracts and to verify if the protective properties of these fruits remain after the processing that generates the extracts. Thus, the objectives of this study are: 1) To determine the phenolic content and antioxidant capacity of cranberry, blueberry and pomegranate extracts; 2) Perform evaluation of oxidative stress markers, markers of inflammatory activity, together with hemodynamic assessment. For this, a placebo-controlled clinical trial was conducted with hypertensive and normotensive subjects who received the fruit extract capsules (blueberry, cranberry and pomegranate) for 4 weeks. Hemodynamic, inflammatory mediators, insulin resistance, and plasma antioxidant activity evaluations were performed. Biochemical analysis of fruit extracts showed that the antioxidant activity of phenolic components remains in the capsules. The HOMA-IR index, that discloses insulin resistance, decreased significantly after capsule consumption. Although there were no hemodynamic changes, there was a decrease in lipid peroxidation after capsule consumption and an increase in catalase activity. The results of this study suggest that supplementation with cranberry, blueberry and pomegranate capsules can reverse oxidative damage and reduce insulin resistance in hypertensive patients.

Descriptors: Antioxidants; Fruit; Insulin resistance; Oxidative stress; Hypertension; Polyphenols.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

Doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias são responsáveis por 59% das mortes. Os fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças são hipertensão, altos níveis de colesterol, obesidade, sedentarismo, uso de álcool e tabaco, além do baixo consumo de frutas e vegetais. É interessante notar que todos esses fatores de risco são passíveis de prevenção (WHO, 2003).

De acordo com o World Health Report 2002, o baixo consumo de frutas e vegetais está envolvido em 31% dos infartos do miocárdio e 11% dos acidentes vasculares cerebrais. Devido a seu alto poder antioxidante e seu conteúdo de fibras, recomenda-se o consumo diário de 400g de frutas e vegetais (ou 150 kg por ano), por pessoa, - excluindo-se batatas e outros tubérculos- para prevenção de doenças crônicas, câncer e obesidade e manutenção do equilíbrio de micronutrientes (Guia Alimentar para a População Brasileira, 2014).

Grandes esforços devem ser feitos para promover mudanças ambientais e comportamentais no sentido de incentivar o consumo de frutas e verduras, envolvendo políticas públicas para agricultura, especialistas dos campos da nutrição, da farmácia, da medicina, da gastronomia e da logística de distribuição (WHO, 2003). Faz-se necessária também a pesquisa científica nesse campo, promovendo o conhecimento das propriedades das diversas

frutas e vegetais e dos fatores que podem influenciar no seu consumo, de modo a maximizar o benefício à saúde desejado.

Embora o consumo da fruta *in natura* ou sob a forma de sucos seja a melhor forma de aquisição de seus componentes nutricionais, a cápsula tem a vantagem de ser facilmente consumida e possuir longa duração. Assim sendo, são necessários estudos que tragam evidências científicas sobre a suplementação de antioxidantes sob a forma de frutas encapsuladas.

O Departamento da Agricultura dos Estados Unidos realizou uma análise de mais de 300 alimentos e dentre aqueles com maior atividade antioxidante estão algumas frutas ricas em antocianinas, que são pigmentos de origem vegetal, solúveis em água e que conferem coloração de vermelho a azul a frutas e legumes (HAYTOWITZ e BHAGWAT, 2010). As frutas encapsuladas utilizadas no presente estudo (mirtilo, cranberry e a romã) pertencem a esse grupo.

Ainda que existam evidências, em humanos, que a administração de suco de romã e cranberry leva à redução da inflamação vascular (DOHADWALA et al., 2011; ASGARY et al., 2013; ASGARY et al., 2014) e que a literatura seja rica em pesquisas com dietas enriquecidas em antioxidantes em animais experimentais (VINSON et al., 2008; ELKS et al. 2011), não foi possível encontrar estudos que tenham usado extratos de frutas em cápsulas como forma de apresentação.

Assim sendo, é necessário verificar se as propriedades protetivas dessas frutas se mantem após o processamento que gera os extratos. Mais ainda, é necessário saber se os efeitos protetivos se fazem presentes mesmo

Quando a ingestão do extrato se dá em combinação com outros alimentos da rotina pessoal, que podem ter grandes quantidades de sal ou gorduras.

O estudo aqui apresentado é mais um passo dado nessa direção, trazendo uma colaboração que pode ajudar na escolha de suplementos alimentares sob a forma de extratos de frutas, cuja ação antioxidante, além de se manter preservada, se traduz em alterações metabólicas que protegem o organismo contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

1.2 A HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é conceituada como uma condição clínica multifatorial com elevação sustentada dos níveis pressóricos maiores ou iguais a 140mmHg para a pressão sistólica e/ou 90mmHg para pressão diastólica, sendo considerada o principal fator de risco para doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência vascular periférica, além de ser a condição clínica mais comum observada na atenção primária à saúde (MALACHIAS et al., 2016).

No Brasil, a hipertensão atinge 32,5% de indivíduos adultos e mais de 60% dos idosos, contribuindo para metade das mortes por doença cardiovascular, embora seja considerada um fator de risco cardiovascular possível de modificação. Em 2018, a prevalência de hipertensão em adultos foi de 24,7% na população brasileira, chegando a 60,9% em indivíduos acima de 65 anos de idade (VIGITEL Brasil 2018).

A hipertensão arterial é frequentemente associada a alterações no metabolismo da glicose, incluindo a resistência à insulina. A resistência à insulina gera uma vasoconstrição, ocasionando hipertensão arterial por atenuar a produção de óxido nítrico e a capacidade de vasodilatação. Outra consequência da resistência à insulina é a redução da excreção renal de sódio, que causa hipernatremia e o aumento das concentrações circulantes de substâncias do sistema renina-angiotensina-aldosterona que, por sua vez, contribui para a hipertensão (LOPES et al., 2016).

O outro mecanismo fisiopatológico envolvido na hipertensão que tem recebido grande atenção da comunidade científica nos últimos anos é o estresse oxidativo. Esta condição é caracterizada pelo desequilíbrio entre a produção e a degradação de moléculas reativas, entre os quais se destacam as espécies reativas de oxigênio. Esse desequilíbrio promove disfunção endotelial, remodelamento vascular e inflamação e, por consequência, provoca hipertensão. Ressalta-se que a própria hipertensão pode gerar inflamação e aumento dos radicais livres, estabelecendo-se assim, um circuito de manutenção da condição patológica (DINH et al., 2014).

Terapias não medicamentosas, como mudanças no estilo de vida, hábitos alimentares saudáveis e prática de atividade física, têm se mostrado eficazes na redução da pressão arterial. Estudos prévios mostraram redução da pressão arterial por meio de uma dieta rica em frutas e vegetais como a dieta do Mediterrâneo ou a dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) (SACKS et al., 2001; LOPES et al., 2003). Sugere-se que um dos principais fatores responsáveis pelos resultados positivos dessas dietas

seja a alta concentração de compostos bioativos como os antioxidantes (MEDINA-REMON et al., 2015) .

Assim sendo, aumentar o consumo de alimentos ricos em antioxidantes pode causar um impacto benéfico no organismo. Há evidências de melhora da função endotelial em indivíduos com síndrome metabólica (STULL et al., 2015) e, mesmo em indivíduos saudáveis, foram observadas alterações metabólicas tais como a redução de triglicérides e de proteína C reativa, níveis menores de resistência à insulina e de pressão arterial diastólica, além de efeitos antiaterogênicos como inibição da oxidação do LDL-colesterol e da peroxidação lipídica (ROSENBLAT et al. 2010; NOVOTNY et al., 2015).

A HAS, como a maioria das doenças crônicas, envolve elementos hereditários, etiológicos e ambientais, sendo, então, conhecida como uma doença poligênica e multifatorial, que pode provocar mudanças morfológicas e funcionais no sistema nervoso autônomo e cardiovascular (MALACHIAS et al., 2016).

Medidas de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) têm sido utilizadas para avaliar o balanço simpato-vagal, principalmente o componente vagal. De forma geral, a VFC reproduz as oscilações dos intervalos entre batimentos cardíacos subsequentes (intervalos R-R), que estão relacionadas aos efeitos do sistema nervoso autônomo sobre o nó sinoatrial, sendo uma medida não-invasiva, que pode ser aplicado na identificação de eventos relacionados ao sistema nervoso autônomo (SALES et al., 2012).

A função do sistema nervoso autônomo na hipertensão é uma importante área de investigação, uma vez que o sistema nervoso autônomo e hormônios controlados pelos pressoreceptores participam de alterações de

valores basais da pressão arterial. A interação entre os sistemas fisiológicos depende de fatores genéticos e ambientais, como dieta e atividade física, por exemplo, sendo difícil afirmar se as alterações fisiológicas são causa ou consequência das alterações da pressão arterial (LOPES et al., 2000; SALES et al., 2012). A elucidação dos mecanismos fisiopatogênicos é fundamental para a melhor orientação terapêutica do paciente hipertenso (MALACHIAS et al., 2016).

A atividade simpática, modulada pelas aferências de diferentes reflexos e substâncias vasopressoras circulantes ou elaboradas pelas células endoteliais e musculares lisas da parede arterial, aparenta ter relevante papel, não só na origem como na continuidade da hipertensão. Já foi demonstrado que o simpático está associado com o aumento do tônus da parede vascular, influenciando a resistência vascular periférica, um fator importante na manutenção da pressão arterial elevada (LOPES et al., 2000).

1.3 RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina é definida como um estado no qual o organismo tem necessidade de uma quantidade de insulina maior do que a normal para provocar uma resposta normal (GUTIÉRREZ-RODELO et al., 2017).

O termo resistência à insulina é utilizado para descrever a incapacidade de a insulina promover a entrada da glicose nas células como deveria acontecer normalmente. A resistência à insulina se caracteriza pela impossibilidade da ligação entre a insulina e o receptor de insulina da superfície

celular de células musculares, hepatócitos e adipócitos. A falha pode ser genética ou pode ser devido a uma supersaturação de moléculas energéticas no organismo (ácidos graxos, glicerol, glicose e principalmente Acetil CoA) que, como consequência, provoca a desativação dos receptores de insulina na superfície celular. Devido a essa relação entre o microambiente e o aparecimento da resistência à insulina, esta condição pode ser revertida com a mudança dos hábitos alimentares e atividade física (ROBERTS et al., 2013).

Em associação à resistência à insulina ocorrem também outras alterações metabólicas e cardiovasculares, ocasionando a síndrome metabólica. As alterações mais comumente encontradas nessa situação são hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade, hiperuricemia, quadro de estresse fisiológico e o próprio diabetes tipo 2 (ROBERTS et al., 2013). De fato, a resistência à insulina pode ser detectada 5 anos antes do diagnóstico de diabetes pela hiperglicemia plasmática (ABDUL-GHANI et al., 2006).

Além de fatores de regulação gênica, a resistência à insulina pode advir de desnutrição fetal que provoca uma desregulação metabólica no adulto, acúmulo de gordura visceral, sedentarismo, desequilíbrio hormonal e agentes farmacológicos (ABDUL-GHANI et al., 2006).

A resistência à insulina pode ser encontrada em cerca de 30% da população nos Estados Unidos, porém sua incidência é muito maior (70%) no grupo de mulheres com sobrepeso ou obesas (KOCELAC et al., 2012).

1.4 O ESTRESSE OXIDATIVO E SEUS MARCADORES

Todos os organismos vivos produzem continuamente moléculas reativas que atuam na transferência de elétrons nas reações metabólicas, participando em processos, como por exemplo, na geração de ATP na fosforilação oxidativa, na ativação gênica e nos mecanismos de defesa contra infecções e tumores, sendo, portanto, fundamentais para a homeostase celular. As moléculas reativas pertencem a três classes distintas: espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e espécies reativas de enxofre (MAGDER, 2006).

A maioria das espécies reativas possui um elétron desemparelhado sua órbita mais externa, sendo, por isso chamadas de Radicais Livres; no entanto, há espécies reativas que não possuem esse elétron desemparelhado, sendo conhecidas como “não-radicais”, como por exemplo, H_2O_2 e HOCl, mas que ainda assim apresentam grande capacidade de oxidar outras moléculas na sua redondeza (CAROCHO E FERREIRA, 2013).

O equilíbrio entre a produção e a neutralização das espécies reativas é muito delicado e, caso haja a um acúmulo dessas moléculas, as células começam a sofrer as consequências do estresse oxidativo. Portanto, o estresse oxidativo ocorre quando há um aumento reações oxidantes não acompanhado por um aumento de reações antioxidantes. Esse desequilíbrio está na base de várias doenças como aterosclerose, o diabetes mellitus, asma, artrite e doenças reumáticas, sendo apontado como de maior influência para a resistência à insulina e a hipertensão arterial, o que explica sua importância na síndrome metabólica (TELES et al., 2011). Estima-se que a cada dia, uma

célula humana seja alvo de espécies reativas cerca de 10^5 vezes (VALKO et al., 2004).

1.4.1 Marcadores do Dano Oxidativo

Os alvos principais de oxidação são lipídeos (afetando diretamente as membranas celulares), proteínas (levando à disfunção estrutural e enzimática dos tecidos), e DNA/RNA, promovendo alterações da regulação gênica e mutações (BARBOSA et al., 2008).

A meia-vida das espécies reativas de oxigênio é muito curta e isso impede a sua quantificação com métodos laboratoriais simples. Assim sendo, a avaliação do dano oxidativo tem como alvo os sub-produtos mais estáveis das reações de oxidação dos lipídeos, proteínas e do DNA (BARBOSA et al., 2008).

Desta forma, para avaliação da peroxidação lipídica quantifica-se, por colorimetria, a concentração de malondialdeído (um sub-produto estável da reação oxidativa) cuja presença é facilmente verificada devido à sua capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico, na técnica conhecida como TBARS (MARROCCHO et al., 2017).

Por sua vez, a avaliação do dano oxidativo às proteínas se faz meio dos grupos carbonilas. Os principais alvos de oxidação nas proteínas são os resíduos de Prolina, Arginina, Lisina e Treonina das cadeias laterais de aminoácidos (FRIJHOFF et al., 2015).

1.4.2 Marcadores da Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante pode ser definida como a possibilidade do organismo de inibir ou reduzir à ação deletéria das agentes oxidativos, tanto impedindo sua formação, como prevenindo sua ação ou promovendo o reparo das estruturas celulares atingidas (MARROCCO, 2017)

Nesta linha de defesa molecular, há componentes enzimáticos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), ao lado de componentes não enzimáticos (como as vitaminas, minerais e os compostos fenólicos) (RAHMAN, 2007).

Sistema antioxidante enzimático

As enzimas SOD, CAT e GPx atuam tanto na prevenção como no controle da reação oxidativa. As funções da CAT e da GPx tem ação sinérgica, impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, ao convertê-lo em H₂O e O₂. Esta é uma defesa essencial para o organismo porque o peróxido de hidrogênio gera radicais hidroxila (OH•), contra os quais não há mecanismos de defesa, sendo o principal iniciador dos processos de peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Um dado interessante é que uma única molécula de CAT tem a capacidade de converter 6 bilhões de moléculas de H₂O₂ (RAHMAN, 2007).

A SOD catalisa o processo de dismutação, fazendo com que o radical O₂•, ao receber íons de hidrogênio, gere peróxido de hidrogênio (H₂O₂), acelerando a reação na ordem de 10⁴ vezes. Esta enzima necessita de um co-fator não enzimático: cobre ou zinco no caso da SOD citoplasmática ou Mn para a SOD mitocondrial (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Sistema antioxidante não-enzimático

O sistema de defesa não-enzimático é principalmente de origem dietética, sendo que seus principais componentes são as vitaminas (como a vitamina A, C e E), os minerais (Zn, Cu, Se, Mg) e os compostos fenólicos (BARBOSA, 2008).

Os compostos fenólicos (que são o objeto desse estudo) são encontrados nas plantas e fungos, atuando como bacteridas, no reparo das suas feridas, reprodução, crescimento, além de protegerem contra os raios UV por conferirem pigmentação, sendo poderosos antioxidantes (HAYTOWITZ et al., 2010).

Existem cerca de 5000 tipos de fenóis, sendo que metade deles são flavonoides que representam os mais comuns antioxidantes encontrados em frutas, folhas, sementes e fungos. São compostos de baixo peso molecular, constituídos por 15 átomos de carbono, organizados em dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico. Dependendo do tipo de anel heterocíclico, os flavonoides se classificam em flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (catequinas), isoflavonas, antocianinas e antocianidinas (HAYTOWITZ et al., 2010).

As frutas e os vegetais tem uma concentração importante de compostos antioxidantes, como polifenóis (flavonoides e outros), carotenoides e vitaminas A, C e E (GUIA ALIMENTAR PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA, 2014). Estudos *in vitro* mostraram que os compostos fenólicos podem interagir com agentes oxidantes e neutralizar a cadeia de reações antes que a viabilidade celular seja seriamente afetada (KUMAR e PANDEY, 2013). Os grupamentos hidroxila dos flavonoides, além de eliminar os radicais livres, também tem

outros efeitos no organismo como quelação de metais geradores de radicais livres. Assim sendo, estes antioxidantes têm se mostrado muito eficazes, in vitro e in vivo, contra doenças crônicas não transmissíveis, infecções, cânceres, alergias, inflamações e vírus (SEERAM et al., 2007).

1.5 INTERVENÇÃO NUTRICIONAL COMO PREVENÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR

As mudanças de estilo de vida têm se apresentado como propostas seguras e eficazes para o tratamento de indivíduos com pré-hipertensão e no estágio inicial da doença. As mudanças sugeridas para redução da pressão arterial são: restrição de sal, moderação do consumo de álcool, exercício físico regular, cessação do tabagismo, aumento do consumo de legumes e frutas, adoção de dietas com baixo teor de gordura e redução do peso corporal para indivíduos com sobrepeso ou obesidade. Já está bem estabelecido na literatura que uma dieta adequada pode prevenir e até tratar a hipertensão (MALACHIAS et al., 2016).

Vários estudos e meta-análises têm relatado o efeito protetor da dieta de tipo Mediterrânea para doenças cardiovasculares. Embora não se configure como uma dieta específica, abrange um conjunto de hábitos tradicionalmente seguidos pela população dos países vizinhos ao Mar Mediterrâneo. Do ponto de vista alimentar suas principais características são: alta ingestão de azeite de oliva, oleaginosas, frutas, cereais, moderada ingestão de peixe e aves, baixa ingestão de laticínios, carne vermelha, embutidos, doces e o consumo moderado de vinho (ESTRUCH et al., 2013).

Ainda que a dieta do Mediterrâneo esteja indicada para prevenção de fatores de risco cardiovasculares, a dieta *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH) foi a que mostrou melhor resultado na redução da pressão arterial em pacientes com hipertensão estabelecida. A dieta DASH estimula o consumo de grãos integrais, laticínios magros, alimentos ricos em proteínas, fibras, potássio, magnésio e cálcio, como frutas e legumes, feijão, nozes, e desencoraja a ingestão de alimentos ricos em açúcar e gordura saturada. Apesar de não ser uma dieta com redução de sódio, os estudos demonstram que a combinação da dieta DASH à prática regular de atividade física e redução do peso tem importante impacto na população hipertensa (BLUMENTHAL et al., 2010).

Um estudo comparativo entre a dieta típica consumida nos Estados Unidos e a dieta DASH mostra que a dieta DASH promoveu, em uma população saudável, a redução de 5,5 mmHg na pressão arterial sistólica (PAS) e 3,0 mmHg pressão arterial diastólica (PAD). A dieta foi ainda mais eficiente para aqueles com diagnóstico de hipertensão, com redução média na PAS e PAD de 10,7 e 4,7 mmHg, respectivamente (SACKS et al., 2011).

Estudos mostram que, em sujeitos hipertensos obesos, além de reduzir a pressão, a dieta DASH promoveu redução do estresse oxidativo e aumento da capacidade antioxidante (LOPES et al., 2003).

Considerando a prevalência da hipertensão na população em geral, devem ser estimuladas estratégias preventivas, entre elas modificações dietéticas com aumento do consumo de alimentos ricos em compostos bioativos, com utilização, inclusive, de complementos dietéticos que visam atenuar a hipertensão e suas complicações (MALACHIAS et al., 2016).

Estudos em humanos sugerem que a ingestão dietética de certos flavonoides, como os presentes nas frutas vermelhas, está associada a uma redução de fatores de risco de doenças cardiovasculares, com efeitos favoráveis sobre a agregação plaquetária, pressão arterial e metabolismo de lipídeos (JOHNSON et al., 2015).

1.6 CARACTERÍSTICAS DO MIRTILO, CRANBERRY E ROMÃ

As frutas escolhidas para serem oferecidas, no formato de extrato seco em cápsulas, são ricas em oxidantes, com baixo conteúdo lipídico e baixo valor calórico (Tabela 1).

Tabela 1 – Características químicas das frutas cranberry, mirtilo e romã; os valores referem-se ao peso fresco da fruta (exceto para polifenóis na romã cujo valor corresponde a 100mL de suco).

	Cranberry	Mirtilo	Romã
Valor energético (kcal)	46	57	83
Água (g/100g)	87,13	84,21	77,93
Proteína (g/100g)	0,39	0,74	1,67
Gorduras (g/100g)	0,13	0,33	1,17
Carboidratos (g/100g)	12,2	14,49	18,7
Fibra (g/100g)	4,6	2,4	4
Vitamina C (mg/100g)	13,3	9,7	10,2
Polifenóis ¹	139.50 mg/100g	223.41 mg/100g	203.75 mg/100mL

Valores obtidos em Departamento de Informática em Saúde, Escola Paulista de Medicina/Unifesp. Tabela de Composição Química dos Alimentos.

1- Neveu et al., 2010 - Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods.

Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*)

O cranberry aparece ilustrado na Figura 1.



Figura 1 – Fotos ilustrativas do Cranberry. São frutos de pequena dimensão, com casca de coloração rosácea a vermelho intenso, polpa clara e número variado de sementes.

É uma fruta originária da América do Norte, pertencente à Família Ericaceae, a mesma da azaléia; seu uso medicinal era já conhecido há séculos pelos povos indígenas pelas propriedades antissépticas (VINSON, 2008).

O Chile é o maior produtor de cranberry do mundo (HEINONEN, 2007); no Brasil é difícil se encontrar a fruta *in natura*, sendo comercializada sua forma desidratada ou em como sucos em embalagens de longa duração.

Os compostos bioativos predominantes no cranberry são polifenóis (principalmente flavonoides, flavonóis, flavonas, antocianinas e taninos) que lhe conferem propriedades terapêuticas (CÔTÉ et al., 2010).

Suas propriedades benéficas têm sido identificadas no combate à cárie dentária, úlceras estomacais, câncer e principalmente para infecções bacterianas do trato urinário (HEINONEN, 2007). Um estudo com suplementação de dois copos por dia de suco de cranberry, durante oito semanas, demonstrou redução da pressão arterial diastólica em adultos (NOVOTNY et al., 2015).

Mirtilo (*Vaccinium myrtillus*)

Trata-se de um arbusto nativo da Eurásia, que cresce espontaneamente nas florestas temperadas da Europa, Estados Unidos e Canadá, pertencente também à Família Ericaceae. (Figura 2) (SANTOS e RASEIRA, 2002).



Figura 2 – As imagens ilustram os frutos do mirtilo. São bagas cerosas, de coloração azul arroxeada, com polpa macia de sabor agridoce e número variável de pequenas sementes no interior.

Conhecido também como *blueberry*, o mirtilo começou a ser plantado sul do Brasil em 1983 por incentivo da Embrapa (SANTOS e RASEIRA, 2002).

É a quinta fruta com maior quantidade de polifenóis totais quando comparado com outras 40 frutas também ricas em antioxidantes (as quatro primeiras também são “berries”, *blackberries*) (PEREZ-JIMENEZ et al., 2010). Possui flavonoides do tipo antocianina, principalmente. Segundo a Association of Official Analyst Chemists (1995), o mirtilo é uma das frutas com elevada atividade antioxidante (BRAVO, 1988; MICHALSKA e LYSIAK, 2015).

Um estudo demonstrou que o consumo de 50g de extrato de mirtilo reduziu significativamente a pressão arterial em homens obesos e mulheres com síndrome metabólica após oito semanas de consumo (BASU et al., 2010). Este efeito pode ser atribuído à capacidade dos polifenóis de inibir a NADPH

oxidase, o que aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico e reduz a vasodilatação endotélio-dependente (JOHNSON et al., 2015).

Romã (*Punica granatum*)

A romã é um pseudo fruto do tipo balaustia, uma vez a estrutura que se reconhece como fruto não deriva de partes do ovário, mas sim de outras porções da planta modificadas. No interior do pseudo-fruto estão as sementes, cujo episperma é a parte suculenta e comestível (Figura 3) (FISCHER et al., 2011).



Figura 3 – As imagens ilustram a romã. Trata-se de um pseudo-fruto dividido em lóbulos por finas membranas esbranquiçadas. A parte comestível é o episperma das sementes que se apresenta muito desenvolvido, com coloração avermelhada.

A atividade antioxidante da romã pode ser atribuída à presença de alguns componentes como ácido ascórbico e polifenóis, incluindo punicalagina, punicalina, ácido gálico, ácido elágico e antocianinas (FISCHER et al., 2011).

O suco de romã tem potencial para reduzir a pressão arterial em hipertensos e normotensos quando consumido regularmente por 4 semanas (LYNN et al., 2012; ASGARY et al., 2014). Essas evidências serviram de base para a introdução do extrato de romã no presente estudo.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A realização deste estudo está baseada em três principais constatações:

1) A indústria alimentícia tem criado uma série de produtos com frutas para consumo mais prático no dia a dia. Dentre esses produtos, estão diversos tipos de sucos, frutas desidratadas e cápsulas de frutas em pó que já estão sendo comercializadas com o anúncio de seu papel como antioxidantes;

2) A análise da literatura científica mostra que a ingestão de doses elevadas de antioxidantes, consumidos regularmente, inclusive de frutas, está associada à redução da pressão arterial e da inflamação endotelial;

3) Ainda não há estudos sobre o papel desempenhado pela ingestão de cápsulas de extrato em pó de frutas no controle da pressão arterial, resistência à insulina, inflamação, estresse oxidativo e no balanço autonômico em indivíduos hipertensos,

Assim sendo, os objetivos do presente estudo são:

- Determinar o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do extrato de cranberry, mirtilo e romã;
- Realizar avaliação de marcadores de estresse oxidativo, marcadores de atividade inflamatória, juntamente com avaliação hemodinâmica, em pacientes hipertensos que receberam suplementação alimentar com cápsulas de extratos de cranberry, mirtilo e romã.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um ensaio clínico longitudinal, de coorte, prospectivo.

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), sob número CAAE: 46566015.8.0000.0068, com parecer de aprovação no. 1.157.544. Todos os participantes foram previamente esclarecidos quanto aos procedimentos do estudo e solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Esta pesquisa teve suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, número do processo 2014/25808-3, sob responsabilidade do Dr. Heno Ferreira Lopes, do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1. CARACTERÍSTICAS DAS CÁPSULAS

As cápsulas foram compradas diretamente do fabricante Chamais Produtos Naturais (Xanxerê, Santa Catarina). Cada tipo de cápsula pertencia a um mesmo lote e foram adquiridas todas no mesmo momento.

3.1.1 Composição

O fabricante encaminhou a composição das cápsulas, reproduzida na Tabela 2.

Tabela 2: Composição das cápsulas placebo e contendo extrato de frutas

	Concentração (mg)	Parte utilizada	Ingredientes
Placebo	500	-----	Amido. Composição da cápsula: gelatina, corante dióxido de titânio, corante vermelho 40, corante azul brilhante.
Cranberry	400	Fruto total	<i>Vaccinium macrocarpon</i> em pó. Antiumectantes: amido e dióxido de silício. Composição da cápsula: gelatina, corante dióxido de titânio, corante vermelho 40, corante azul brilhante.
Mirtilo	600	Fruto total	<i>Vaccinium myrtillus</i> em pó. Antiumectantes: talco, amido. Composição cápsula: gelatina, corante dióxido de titânio, corante vermelho 40, corante azul brilhante.
Romã	500	Polpa das sementes	<i>Punica granatum</i> em pó. Antiumectante: amido. Composição da cápsula: gelatina, corante dióxido de titânio, corante vermelho 40, corante azul brilhante.

3.1.2. Análise da Capacidade Antioxidante e da Concentração de Compostos Fenólicos nos Extratos de Frutas

Antes da administração aos pacientes, as cápsulas de extrato de frutas foram avaliadas no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, para determinar a atividade antioxidante por meio dos métodos de Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC) e dosagem de fenólicos totais.

Aleatoriamente, algumas cápsulas foram abertas e o extrato foi utilizado para determinação do peso seco para cada fruta. O ensaio foi realizado por gravimetria, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). O procedimento consistiu em acondicionar uma alíquota de 2000 μL de uma solução, contendo o extrato dissolvido, em uma placa de vidro previamente tarada, e aquecimento em estufa a 105 °C por 1 hora, ou mais, com sucessivas pesagens até que não houvesse mais variação de massa. A obtenção da amostra seca é indispensável nas determinações analíticas de atividade antioxidante.

3.1.2.1 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

Princípio do Método: A Capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi determinada de acordo com o método de Cao e colaboradores (1993), com modificações. Esse método baseia-se no fato quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra menor será a formação de peroxila e mais fluorescente será a amostra ao longo do ensaio.

Procedimento técnico: em uma placa de 96 poços (Fisher Scientific, Hanover) foram misturados 150 μL de uma solução de fluoresceína 40nM e 25 μL do extrato hidroalcoólico das cápsulas de frutas. Após incubação a 37°C por 15 minutos, foram adicionados 25 μL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) 153mM, dando-se o início da reação. A intensidade de fluorescência foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 1 hora, em Leitor de Placas *Multi-Detection microplate reader Synergy* (BIOTEK, Vermont, Estados Unidos), excitação em 493nm (filtro 485/20) e emissão em 515nm (filtro 528/20). A capacidade antioxidante foi

determinada pela área sob a curva de decaimento de fluoresceína (AUC). Foi obtida uma curva padrão uma curva padrão de Trolox (6,25-100 μ M, $R^2=0,9958$). Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/g de amostra seca.

3.1.2.2 Método de Folin-Ciocalteu: determinação de compostos fenólicos totais

Princípio do Método: As hidroxilas fenólicas têm capacidade de reduzir o ácido fosfomolibídico-fosfotúngstico (presente no reagente *Folin-Ciocalteu*), gerando um composto de coloração azul.

Procedimento técnico: O extrato das cápsulas foi diluído em metanol; separou-se 0,5mL em tubo de ensaio e adicionaram-se 8mL de água destilada e 0,5mL do reagente *Folin Ciocalteu*. A solução foi homogeneizada e, após 3 minutos, acrescentou-se 1mL de solução saturada de NaCO_3 . Após 1 hora de repouso, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (Coleman 33 D), a 720nm. Utilizou-se como padrão o ácido gálico, nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20; 40; 60 e 80 mg/L para construir a curva padrão. A partir da equação da reta obtida na curva do gráfico do padrão ácido gálico, realizou-se o cálculo da concentração de fenólicos totais, expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra seca (mgEAG/g). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2. CASUÍSTICA

Os participantes hipertensos foram recrutados entre os pacientes que faziam acompanhamento no Ambulatório de Hipertensão do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de janeiro a dezembro de 2016. O diagnóstico de hipertensão foi baseado na 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial e todos estavam medicados com uma ou mais categorias de fármacos anti-hipertensivos, a saber: diuréticos tiazídicos, inibidor da enzima conversora de angiotensina, bloqueador do receptor da angiotensina e bloqueador de canais de cálcio.

Foram incluídos indivíduos hipertensos com idade entre 18 a 59 anos, de ambos os sexos e com índice de massa corporal (IMC) menor que 35 kg/m².

Os critérios de exclusão foram: gestação; tabagismo; portadores de diabetes em uso de mais de um medicamento além de metformina; presença de hemoglobina glicada > 7%; diagnóstico de doença cardiovascular (como arritmia complexa e valvopatias); presença de LDL-colesterol > 160 mg/dL (não diabéticos); presença de com LDL-colesterol > 130 mg/dL (em não diabéticos usando estatina); presença de LDL-colesterol ≥ 100 mg/dL (em diabéticos em uso de estatina); pacientes com hipertensão pulmonar; portadores de doenças do colágeno; pacientes oncológicos; pacientes dialíticos; presença de qualquer patologia crônica invalidante.

Os indivíduos normotensos foram recrutados entre amigos dos participantes hipertensos.

Após exames laboratoriais, os participantes incluídos foram designados para cada grupo segundo a presença ou ausência de hipertensão arterial,

constituindo assim o Grupo Normotenso (com 29 participantes) e o Grupo Hipertenso (com 30 participantes). Entre os hipertensos, apenas 2 (6,7%) pacientes eram diabéticos e 8 (26,7%) pré-diabéticos.

A Figura 4 mostra uma representação esquemática do processo de recrutamento realizado.

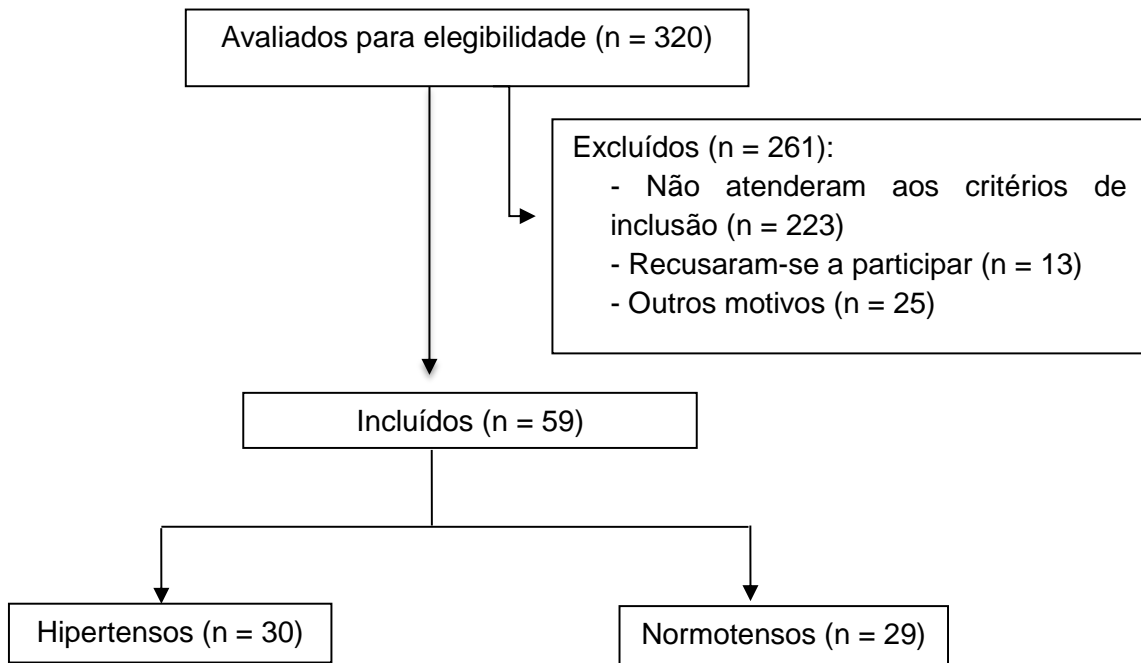


Figura 4. Diagrama de fluxo consolidado dos participantes a partir da análise de dados de recrutamento

Os indivíduos normotensos e hipertensos foram pareados para sexo, idade e índice de massa corporal (IMC).

Os pacientes hipertensos mantiveram o uso de medicamentos durante toda a pesquisa. As classes de medicamentos utilizadas eram: diuréticos (80%), inibidores adrenérgicos (40%), inibidores da enzima conversora de angiotensina (43,3%), bloqueadores dos canais de cálcio (36,6%) e antagonistas do receptor da angiotensina II (36,6%). Os hipertensos e os normotensos não faziam uso de polivitamínicos e/ou outros suplementos alimentares.

Os dados demográficos e o resultado de alguns exames bioquímicos iniciais estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Perfil demográfico e de alguns parâmetros clínicos no início do estudo. A probabilidade de significância (p) foi calculada pelo teste t de *Student* não pareado.

	Normotensos (n=29)	Hipertensos (n=30)	p
Mulheres	16 (55,2%)	17 (56,7%)	0,961
Homens	13 (44,8%)	13 (43,3%)	
Idade (anos)	45,5 ± 8,9	49,3 ± 9,1	0,185
Cor (branca/não branca)	21/8	22/8	0,456
Ureia (mg/dL)	28 ± 5,0	34,2 ± 12,0	0,024
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,380
Sódio (mEq/L)	140,7 ± 2,9	140,3 ± 2,3	0,540
Potássio (mEq/L)	4,5 ± 0,3	4,1 ± 0,5	0,900
Colesterol total (mg/dL)	190,9 ± 34,6	196,3 ± 45,2	0,585
LDL-c (mg/dL)	119,8 ± 28,0	119,2 ± 39,0	0,907
HDL-c (mg/dL)	50,9 ± 13,3	51,8 ± 17,4	0,721
Triglicérides (mg/dL)	110 ± 69	130,1 ± 66,4	0,721

LDL-c – lipoproteína de baixa densidade; HDL-c – lipoproteína de alta densidade.

Os resultados de p mostram que os grupos eram semelhante, exceto para o valor de ureia que se apresentam maiores no grupo hipertenso, mas ainda dentro da faixa de normalidade.

3.3. INTERVENÇÃO

Cada indivíduo participou do estudo por oito semanas. O estudo iniciou-se com a ingestão de cápsulas placebo três vezes ao dia, durante quatro semanas. Em continuação, foi feita suplementação com cápsulas de extrato de frutas, administradas também três vezes ao dia, sendo que no café da manhã

era ingerida uma cápsula de cranberry, no almoço, uma cápsula de mirtilo e, na hora do jantar, uma cápsula de romã.

Tanto no período das cápsulas com placebo como nas cápsulas com extrato de frutas, foi feito contato telefônico com os participantes a fim de acompanhar a adesão. A cada duas semanas os participantes retornavam para entregar as cápsulas que sobraram e receber as restantes. A adesão era verificada pela contagem das cápsulas.

Foram feitas avaliações antropométricas, hemodinâmicas e laboratoriais no início do estudo, após quatro semanas com o uso de placebo e ao final do da suplementação com extrato de frutas.

As cápsulas de placebo eram da mesma cor e formato das cápsulas de extrato de frutas, o que as tornava indistinguíveis para os participantes.

3.4. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Todas as avaliações antropométricas foram realizadas pela pós-graduanda de maneira padronizada. Todas as medidas foram realizadas, em triplicata, utilizando-se a média aritmética como medida final. Foi utilizada a balança com estadiômetro Filizola[®] (Modelo PL 150, Filizola Ltda., Brasil), para obtenção do valor do peso corporal e altura. O IMC foi calculado como a razão entre o peso (kg) e o quadrado da altura (m), conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995). Para a medida da circunferência da cintura (CC) e da circunferência cervical (CCerv) foi utilizada uma fita inelástica de fibra de vidro com precisão de 1 mm. A avaliação da CC foi

realizada seguindo a técnica do ponto médio entre a última costela e crista ilíaca antero-superior e da CCerv foi tomada na posição correspondente ao ponto médio da altura do pescoço dos participantes.

3.5. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

A avaliação da resistência à insulina é embasada na relação de feedback entre a produção hepática de glicose e a produção de insulina pelas células β da ilhota pancreática. Níveis elevados de glicose ou de insulina podem indicar resistência à insulina no indivíduo (Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018).

O índice HOMAIR (Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance) indica o grau de resistência das células hepáticas à insulina. Assume-se a esta última seja igual à resistência à insulina em outras células. O cálculo deste índice utiliza o valor da glicemia (em mmol/L) e da insulinemia (em μ U/mL) de jejum resultantes de exames laboratoriais. Tais valores são multiplicados e o resultado é dividido por 22,5 (fator de normalização). (Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018).

A população brasileira é uma das mais miscigenadas e, levando-se em consideração que a resistência à insulina se manifesta de forma diferente de acordo com a etnia, foram feitos estudos na população brasileira para validação de ponto de corte, tendo sido estabelecido que o valor de corte para adultos e idosos é $> 2,71$ (GELOZENE et al., 2009).

3.6. ANÁLISES CLÍNICAS

A partir de amostras do sangue periférico coletadas, após jejum de 12 horas, foram feitas as seguintes análises no início do estudo: Uréia, Creatinina, Sódio, Potássio, Triglicérides, Colesterol total, LDL-c, HDL-c, Proteína C Reativa (PCR), Glicose, Insulina, Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF-alfa), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1), Adiponectina e Leptina.

Com exceção dos exames para dosagem de Ureia, Creatinina, Sódio, Potássio, Triglicérides e Colesterol total e frações, todos os outros foram repetidos após o consumo de cápsulas de placebo e, novamente, após o consumo das cápsulas contendo extrato de frutas.

As análises clínicas foram realizadas pelo Laboratório do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.7. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

O balanço autonômico foi avaliado de maneira não invasiva. Os voluntários foram orientados a não ingerir café, chá, refrigerante e bebidas alcoólicas e manter as atividades de rotina nas 48 horas antes do exame. Os registros foram realizados em ambiente adequado para aquisição de sinais, com controle de temperatura e luz. Os participantes eram posicionados em decúbito dorsal e permaneciam em repouso até a estabilização da frequência

cardíaca e pressão arterial. Em seguida, mantendo-se a mesma postura, foram realizadas medidas de pressão arterial sistólica e diastólica, registros da FC e dos intervalos RR (sístole + diástole) durante 15 minutos com o monitor Finometer (Finometer, FMS, Finapres Medical System BV, Holland, 2003), através da técnica de fotopletagemografia digital (WESSELING et al., 1995). A frequência cardíaca foi monitorada por meio de eletrodos posicionados no tórax do paciente.

Com os dados obtidos, gravados durante a avaliação, foram realizadas análises de variabilidade da frequência cardíaca e variabilidade da pressão arterial nos domínios tempo e frequência. Para o domínio do tempo utilizou-se a análise de variância do intervalo de batimentos normais, desvio padrão dos intervalos RR normais (SDNN), e a raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR consecutivos (RMSSD). A variabilidade do domínio de frequência (análise espectral) foi avaliada usando o *Fourier Fast Transform*. Foi utilizada uma interpolação de 4 Hz com segmentos de 512 pontos. A razão entre LF (Low frequency) e HF (High frequency) foi calculada para avaliar o balanço autonômico e a medida a variabilidade da pressão arterial, sendo considerados os valores do componente absoluto de baixa frequência (LF PAS).

A análise de balanço autonômico foi realizada com o auxílio dos softwares *Labchart* versão 7 (AD Instruments, Melbourne, Austrália) e *Cardioseries* (v2.0, <http://sites.google.com/site/cardioseries>).

3.8. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Alíquotas de plasma obtido a partir do sangue coletado dos participantes foram utilizadas nos ensaios de avaliação do estresse oxidativo. A atividade antioxidante foi avaliada através da análise das enzimas catalase e superóxido dismutase, enquanto que a atividade de oxidação foi avaliada através da presença de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas.

Todas as avaliações de dano oxidativo e da capacidade antioxidante foram feitas no Laboratório Translacional da Universidade 9 de Julho, sob chefia da Profa. Dra. Katia de Angelis.

O conteúdo proteico das amostras de plasma foi determinado, usando-se o método de BRADFORD (1976), a 595nm, utilizando albumina sérica bovina como padrão para construção de uma curva de calibração.

3.8.1 Medidas de Marcadores do Dano Oxidativo

3.8.1.1 Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

Princípio do método: o malondialdeído (MDA) é um dos inúmeros produtos finais do processo oxidação e decomposição de ácidos graxos polinsaturados (peroxidação lipídica). Assim sendo, sua detecção, no plasma é um forte indicativo da ocorrência de peroxidação lipídica e, portanto, do estresse oxidativo (BUEGE e AUST, 1978). O princípio da utilização do método TBARS (tiobarbicuric acid reactive substances) baseia-se no fato que a adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) na amostra a ser analisada promove a formação de adutos resultantes de sua reação com o MDA presente no plasma (cada

molécula de MDA se complexa a duas de TBA); estes adutos podem ser quantificados por espectrofotometria (REZNICK e PACKER, 1994).

Procedimento técnico: Foram adicionados 0,75 mL de ácido tricloroacético 10% (P/V) a 0,25 mL de plasma. Após centrifugação durante 3 minutos a 1000 g, foram retirados 0,5 mL do sobrenadante, ao qual se adicionou 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reagiu com os produtos da lipoperoxidação, formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e, em seguida, resfriada no gelo. Realizou-se a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro (Biospectro) (REZNICK e PACKER, 1994).

3.8.1.2 Dosagem de proteínas carboniladas:

Princípio do método: A detecção do grupamento carbonila é usada como um marcador de oxidação de proteínas.

Procedimento técnico: Foi realizado ensaio para detecção das carbonilas por meio da reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo com 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguida de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Foi medida a absorbância das carbonilas em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes: guanidina (6M) em HCl 2,5M (pH 2,5), 2,4 DNPH; TCA 20%; TCA 10%; etanol-acetato de etila 1:1 (V/V). Paralelamente, foi determinada a concentração de proteína, com base na curva padrão de albumina (LISSI et al., 1995). O resultado foi obtido em nmol of carbonyl/mg proteína.

3.8.2 Medidas de Marcadores da Capacidade Antioxidante

A medida da capacidade antioxidante pode ser feita pela determinação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD) e pelo método do FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power) (BARBOSA et al., 2008).

3.8.2.1 Determinação da atividade da catalase (CAT):

Princípio do método: Uma vez que a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é diretamente proporcional à atividade da CAT, foi realizado um teste no qual a diminuição da concentração de H_2O_2 serve como indicativo da presença da catalase no plasma dos participantes (BOVERIS e CHANCE, 1973).

Procedimento técnico: O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância a 240nm, comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão fosfato a 50 mmol/L em pH 7,4. Foram adicionados 9 μ L deste tampão e 10 μ L de amostra de tecido na cubeta de espectrofotômetro, sendo esta mistura comparada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35 μ L de peróxido de hidrogênio (0,3mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro (Biospectro) (BOVERIS e CHANCE, 1973).

3.8.2.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD):

Princípio do Método: O pirogallol é uma substância que sofre um processo de auto-oxidação rapidamente, com a participação do superóxido (O_2^-

), quando em soluções alcalinas (pH cerca de 8,0), liberando uma cor que pode ser avaliada por espectrofotometria a 420nm. Por ser dependente de superóxido, esta reação pode ser inibida na presença de SOD. Assim sendo, quantificar a taxa de inibição da auto-oxidação do pirogalol, na presença da SOD, é um bom método de avaliação da atividade dessa enzima. Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Assim sendo, uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que diminui em 50% a velocidade de auto-oxidação do pirogalol nas condições do teste (MARKLUND E MARKLUND, 1974).

Procedimento técnico: Para medir a velocidade de oxidação do pirogalol, em uma cubeta de 1mL, foi preparada uma solução alcalina (pH 8,2) com 985µL de tampão Tris-Fosfato a 50mmol/L, 10µL de pirogalol a 24 mmol/L e 5µL de CAT a 30 µmol/L. A absorbância foi lida a 420nm, a cada 30 segundos, durante 3 minutos e representada graficamente em função do tempo. O mesmo procedimento foi feito para leitura da absorbância em cubetas às quais foram sido adicionadas três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), regulando-se a quantidade de tampão para atingir volume final de 1mL. Com os dados obtidos foi construída uma curva padrão de velocidade de inibição da auto-oxidação do pirogalol. Finalmente, a medida da atividade da SOD plasmática foi obtida em uma solução contendo 15 µL de plasma dos participantes à mistura de Tampão (970µL), pirogalol (10µL) e catalase (5µL), cuja absorbância também foi lida em intervalos ao longo do tempo. A concentração de SOD foi determinada, em U/mg de proteína, de acordo com a curva padrão feita a partir de concentrações de SOD conhecidas.

3.8.2.3 *FRAP - "Ferric Reducing Antioxidant Power"*

Princípio do método: O ensaio mede o poder antioxidante da amostra a ser testada pela sua capacidade de a partir do íon Fe^{3+} (íon férico) originar o íon Fe^{2+} (íon ferroso). Assim, a mudança na absorbância é diretamente proporcional ao poder de doação de elétrons antioxidantes presentes na amostra. Quando a redução ocorre, há uma alteração de intensidade de cor da solução, passando de roxo claro a roxo intenso e, assim sendo, quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior é a capacidade antioxidante total da amostra (BENZIE e IFSTRAIN, 1999).

Procedimento técnico: A técnica foi realizada em microplaca, na qual adicionou-se 10 μl de uma solução-padrão de sulfato ferroso heptahidratado ou 10 μL de amostra a 290 μL de reativo de FRAP [tampão acetato de sódio e ácido acético, pH 3,6; 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10mM; cloreto férrico hexahidratado 20Mm]. A microplaca foi incubada durante 5 minutos com agitação à 37°C. A leitura foi realizada a 593nm (BENZIE e IFSTRAIN, 1999).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi realizado considerando um estudo sobre o efeito de uma dieta rica em antioxidantes sobre os níveis de pressão arterial e estresse oxidativo em hipertensos e normotensos (LOPES et al., 2003). O poder estatístico considerado para o cálculo foi 80%, o intervalo de confiança 95%, sendo o número de casos necessários em cada grupo estimado em 27

indivíduos. O cálculo da amostra foi realizado com auxílio do programa OpenEpi versão 2013.

As análises descritivas para os dados quantitativos foram realizadas, apresentado as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (DP). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados respectivamente, com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para as variáveis quantitativas foi utilizada ANOVA de medidas repetidas. Para aquelas comparações que deram diferença significativa pelo ANOVA, foi realizado o teste post-hoc dois a dois, com correção de Bonferroni.

Quando foi detectada uma diferença significativa entre os dados obtidos após a ingestão das cápsulas com extrato de frutas e os dados obtidos no início do estudo (ou ao final da fase placebo) no grupo de hipertensos, foi aplicado o Teste t de *Student* não pareado para comparação com o dado do grupo normotenso, no intuito de verificar se os valores significativos obtidos para os hipertensos eram no sentido de aproximá-los ao grupo dos normotensos.

Todas as análises foram realizadas no software SPSS 21 para Windows com nível de significância de $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS

Os Resultados desse estudo estão apresentados na mesma sequência em que foram apresentados os métodos utilizados.

Uma vez estabelecidos os grupos não houve abandono e todos os participantes concluíram as oito semanas de acompanhamento. O percentual de adesão, calculado pela contagem das cápsulas foi de aproximadamente 98% entre os normotensos e 95% entre os hipertensos.

4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS DE FRUTAS

Os resultados obtidos para o Teor de Compostos Fenólicos (pelo método de Folin-Ciocalteu) e para a capacidade antioxidante (pelo método ORAC) estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Potencial Antioxidante Total medido pelo método ORAC e Concentração de Compostos Fenólicos Totais medida pelo método de Folin-Ciocalteu nos extratos de frutas.

	Capacidade Antioxidante ORAC (μmol Trolox/g extrato)	Compostos Fenólicos (mg EAG/g extrato)
Cranberry	965,4 \pm 27,7	96,0 \pm 5,7
Mirtilo	731,8 \pm 28,0	87,2 \pm 9,1
Romã	676,3 \pm 17,9	111,9 \pm 2,3

EAG – equivalente de ácido gálico.

Os resultados mostram que a capacidade antioxidante estava presente mesmo após o processamento das frutas para originar o extrato. Da mesma

forma, os compostos fenólicos também foram detectados no extrato presente nas cápsulas.

4.2. DADOS DA AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos nas medidas antropométricas. Os grupos foram comparados quanto a peso, IMC, circunferência da cintura e circunferência cervical.

Tabela 5 – Perfil antropométrico dos indivíduos normotensos (N) e hipertensos (H) no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx). Valores expressos como média \pm desvio padrão. A probabilidade de significância (*p*) da comparação intragrupo foi calculada pelo ANOVA de medidas repetidas.

	Normotensos (n=29)				Hipertensos (n=30)			<i>p</i>	
	NI	NP	NEx	<i>P</i>	HI	HP	HEx		
Peso (kg)	76,7 $\pm 12,2$	76,8 $\pm 2,2$	76,5 $\pm 12,3$	0,074	77,3 $\pm 12,2$	77,6 $\pm 15,2$	77,7 $\pm 15,1$	0,425	
IMC (kg/m ²)	28,0 $\pm 3,7$	28,1 $\pm 3,7$	27,9 $\pm 6,2$	0,122	28,6 $\pm 3,9$	28,8 $\pm 4,0$	28,8 $\pm 4,0$	0,452	
Ccerv (cm)	36,7 $\pm 3,2$	36,7 $\pm 3,0$	36,7 $\pm 3,0$	0,972	37,8 $\pm 3,3$	37,2 $\pm 3,3$	37,6 $\pm 3,8$	0,205	
CC (cm)	Fem	94,2 $\pm 7,7$	94,0 $\pm 7,2$	93,2 $\pm 7,0$	0,243	91,3 $\pm 10,0$	90,6 $\pm 9,8$	91,3 $\pm 10,1$	0,286
	Masc	89,4 $\pm 18,8$	94,3 $\pm 8,6$	94,0 $\pm 7,7$	0,750	100,5 $\pm 10,6$	101,4 $\pm 11,9$	101,3 $\pm 11,9$	0,540

IMC – Índice de Massa Corporal; CC – Circunferência da Cintura; Ccerv – Circunferência Cervical.

O teste ANOVA para medidas repetidas mostrou que não houve alteração no perfil antropométrico após a suplementação com extratos de frutas em ambos os grupos.

Tomando-se em consideração que o IMC é considerado de eutrofia até 24,9kg/m², sobrepeso entre 25 a 29,9 kg/m² e obesidade grau I de 30 a 34,9 kg/m², os resultados mostraram que 40% dos pacientes hipertensos foram classificados com obesidade grau 1, 36,7% com sobrepeso e 23,3% eutróficos. Dos participantes normotensos 37,9% eram obesos grau 1, 31,5% tinham sobrepeso e 31,5% eutróficos.

4.3. DADOS DE RESISTÊNCIA À INSULINA

O teste de ANOVA mostrou que para o índice HOMAIR houve uma diferença significativa intragrupo entre os normotensos em diferentes tempos ($p= 0,001$) e o mesmo aconteceu no grupo hipertenso ($p=0,001$), como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 – Glicemia de jejum, insulinemia e Índice HOMAIR indicativo da resistência à insulina em indivíduos normotensos (N) e hipertensos (H) no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx). Valores expressos como média \pm desvio padrão. A probabilidade de significância (p) da comparação intragrupo foi calculada pelo ANOVA de medidas repetidas.

	Normotensos (n=29)				Hipertensos (n=30)			
	NI	NP	NEx	p	HI	HP	HEx	P
Glicose (mg/dL)	90,6 $\pm 6,9$	91,0 $\pm 8,7$	90,3 $\pm 7,3$	0,848	106,6 $\pm 40,6$	102,8 $\pm 31,7$	104,7 $\pm 33,8$	0,507
Insulina (UI/mL)	10,2 $\pm 5,3$	11,8 $\pm 6,1$	12,5 $\pm 8,8$	0,086	12,5 $\pm 7,3$	13,3 $\pm 8,6$	13,5 $\pm 7,4$	0,567
HOMAir	2,3 $\pm 1,2$	2,4 $\pm 1,5$	1,0 $\pm 0,7$	0,001	3,4 $\pm 2,7$	3,0 $\pm 2,6$	1,3 $\pm 1,4$	0,001

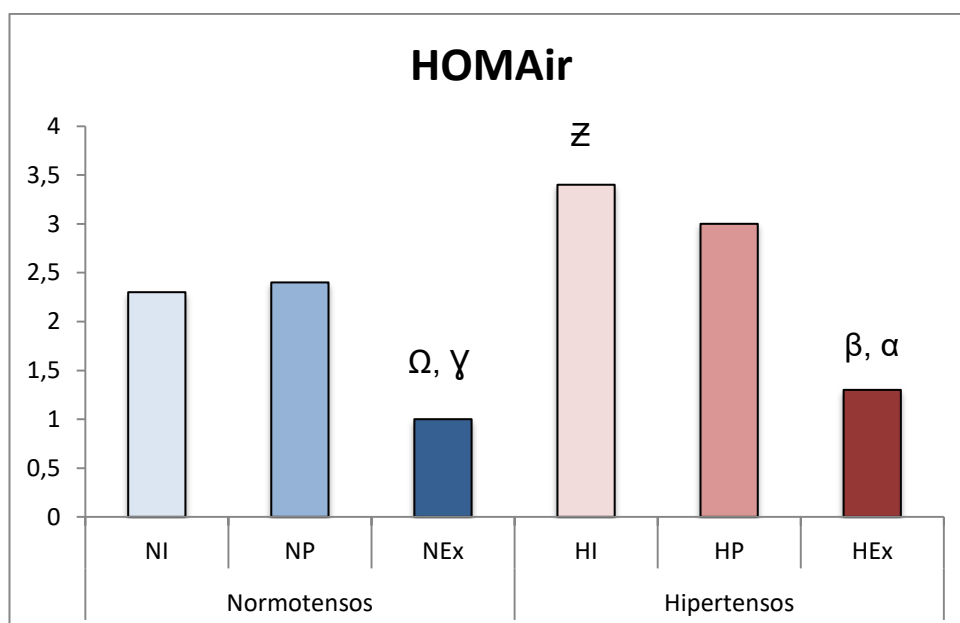
HOMAIR = *homeostatic model assessment of insulin resistance*.

O teste post-hoc de Bonferroni mostrou que, tanto para os normotensos quanto para os hipertensos, as medidas iniciais foram semelhantes às pós-placebo e que as medidas pós-intervenção são estatisticamente menores que as anteriores. Observar que os índices de resistência à insulina pós-intervenção reduziram-se para valores abaixo da metade dos iniciais.

A comparação estatística entre os normotensos e hipertensos após a ingestão de cápsulas foi feita pelo teste de t de *Student* não pareado e mostrou que não há diferença significativa ($p=0,12$) nos valores de HOMAIR, ou seja, após a suplementação o grupo hipertenso apresentou índice de resistência equivalente ao normotenso, eliminando a diferença estatística que havia entre eles no início do estudo ($p=0,039$).

O Gráfico 1 ilustra esses achados.

Gráfico 1– Avaliação do índice HOMAIR dos indivíduos normotensos e hipertensos no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx). O teste post-hoc de Bonferroni mostra as diferenças significativas intragrupos: Ω : NEx versus NI $p<0,001$; Υ : NEx versus NP $p<0,001$; β : HEx versus HI $p<0,001$; α : HEx versus HP $p=0,033$; ζ : HI versus NI $p=0,039$.



4.3. DADOS DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Não houve diferença significativa de citocinas inflamatórias e adipocitocinas após o consumo de antioxidantes, conforme consta na Tabela 7.

Tabela 7. Dosagem plasmática de citocinas inflamatórias e adipocitocinas dos indivíduos normotensos (N) e hipertensos (H) no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx): Valores expressos como média \pm desvio padrão. A probabilidade de significância (p) da comparação intra grupo foi calculada pelo ANOVA de medidas repetidas.

	Normotensos (n=29)				Hipertensos (n=30)			
	NI	NP	NEx	<i>p</i>	HI	HP	HEx	<i>P</i>
PCR (mg/dL)	2,3 \pm 1,8	4,0 \pm 0,0	2,0 \pm 0,1	0,441	3,4 \pm 3,2	3,2 \pm 3,1	3,3 \pm 3,1	0,724
TNF-alfa (pg/ml)	19,0 \pm 15,3	21,5 \pm 18,1	18,6 \pm 14,2	0,680	12,1 \pm 11,2	14,2 \pm 10,8	12,9 \pm 11,2	0,663
IL-6 (pg/ml)	2,9 \pm 2,0	2,8 \pm 1,9	2,6 \pm 2,0	0,849	2,9 \pm 1,7	2,6 \pm 1,2	2,7 \pm 2,,1	0,606
IL-2 (pg/ml)	1,0 \pm 1,7	0,6 \pm 1,2	0,7 \pm 1,0	0,325	1,7 \pm 3,6	1,2 \pm 2,8	0,8 \pm 1,6	0,071
IL-4 (pg/ml)	1,0 \pm 0,8	1,0 \pm 0,7	0,9 \pm 0,7	0,834	0,6 \pm 0,5	0,7 \pm 0,5	0,7 \pm 0,5	0,724
MCP-1 (pg/ml)	1,9 \pm 1,3	1,8 \pm 1,4	1,9 \pm 1,6	0,951	1,4 \pm 0,9	1,5 \pm 0,9	1,4 \pm 1,2	0,953
Adiponectina (mg/L)	11,2 \pm 6,1	10,6 \pm 6,7	11,2 \pm 7,8	0,494	14,6 \pm 10,6	13,6 \pm 9,6	13,9 \pm 9,9	0,31
Leptina (ng/mL)	13,1 \pm 10,2	11,9 \pm 9,2	14,4 \pm 11,9	0,111	13,5 \pm 9,5	12,2 \pm 8,8	13,5 \pm 9,3	0,246

PCR = Proteína C reativa; TNF-alfa = tumor de necrose tumoral alfa; IL-6 = Interleucina-6; IL-2 = Interleucina-2; IL-4 = Interleucina-4; MCP-1 = proteína 1 quimotática para monócito.

4.5. DADOS DOS PARAMETROS HEMODINÂMICOS

A Tabela 8 mostra os dados obtidos na avaliação hemodinâmica.

Tabela 8 – Análise hemodinâmica e espectral dos indivíduos normotensos (N) e hipertensos (H) no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx): Valores expressos como média \pm desvio padrão. A probabilidade de significância (p) da comparação intra grupo foi calculada pelo ANOVA de medidas repetidas.

	Normotensos (n=29)				Hipertensos (n=30)			
	NI	NP	NEx	p	HI	HP	HEx	p
PAS (mmHg)	121,8 \pm 15,6	122,0 \pm 13,4	120,3 \pm 11,7	0,557	141,7 \pm 22,6	143,4 \pm 28,6	137,0 \pm 21,9	0,113
PAD (mmHg)	74,2 \pm 9,6	74,3 \pm 9,4	71,9 \pm 8,7	0,124	83,6 \pm 13,9	86,3 \pm 17,9	79,7 \pm 15,5	0,137
FC (bpm)	64,7 \pm 11,2	66,0 \pm 12,0	67,3 \pm 10,7	0,179	63,7 \pm 10,0	60,6 \pm 10,5	61,7 \pm 9,0	0,081
LF (abs)	470,5 \pm 387,6	490,2 \pm 434,8	717,1 \pm 1099,4	0,507	354,1 \pm 310,1	464,1 \pm 459,9	604,0 \pm 1143	0,341
HF (abs)	320,5 \pm 329,6	365,9 \pm 345,5	459,9 \pm 711,6	0,640	310,6 \pm 324,8	371,7 \pm 438,4	574,6 \pm 1232,6	0,487
LF (n.u.)	60,2 \pm 7,5	59,6 \pm 9,8	61,0 \pm 10,1	0,550	57,7 \pm 12,9	57,5 \pm 10,2	55,6 \pm 12,1	0,389
HF (n.u.)	39,8 \pm 7,5	40,4 \pm 9,8	39,0 \pm 10,1	0,558	42,3 \pm 12,9	42,5 \pm 10,2	44,4 \pm 12,1	0,389
LF/HF	1,7 \pm 0,6	1,7 \pm 0,8	1,8 \pm 0,8	0,420	1,7 \pm 1,0	1,6 \pm 0,8	1,5 \pm 0,7	0,256
SDNN	42,6 \pm 19,3	37,6 \pm 14,6	40,8 \pm 24,5	0,382	35,9 \pm 14,3	37,9 \pm 17,4	41,4 \pm 27,0	0,403
RMSSD	32,5 \pm 21,8	30,6 \pm 17,7	33,1 \pm 25,1	0,770	28,4 \pm 15,1	31,1 \pm 16,6	35,4 \pm 32,0	0,337
LF PAS (abs)	10,0 \pm 8,6	9,5 \pm 7,5	10,0 \pm 7,0	0,945	12,3 \pm 10,4	10,0 \pm 6,1	9,0 \pm 6,6	0,306

PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica; FC – Frequência Cardíaca; LF= banda de baixa frequência; HF= banda de alta frequência; LF/HF - Ratio of LF-to-HF power; SDNN= Desvio padrão de intervalo R-R; RMSSD= raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos RR.

Pode-se notar que não houve diferença na pressão arterial e frequência cardíaca, assim como na análise espectral após a suplementação com cápsulas de frutas.

4.6. DADOS DA AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.6.1. Avaliação dos Marcadores de Dano Oxidativo

A Tabela 9 resume os valores obtidos para indicadores de dano oxidativo tais como peroxidacao lipidica e oxidação das proteínas, nos três tempos avaliados (inicial, pós-placebo e pós-extratos de frutas), mostrando que o consumo de cápsulas de frutas antioxidantes durante 4 semanas reduziu TBARS e carbonilas no grupo de hipertensos.

Tabela 9 – Avaliação do dano oxidativo no plasma dos indivíduos normotensos (N) e hipertensos (H) no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx):: Valores expressos como média \pm desvio padrão. A probabilidade de significância (p) da comparação intra grupo foi calculada pelo ANOVA de medidas repetidas.

	Normotensos (n=29)				Hipertensos (N=30)			P
	NI	NP	NEx	p	HI	HP	HEx	
TBARS (nmol/mg prot)	0,7 \pm 0,4	0,6 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3	0,657	0,9 \pm 0,7	1,0 \pm 0,9	0,5 \pm 0,1	0,002
Carbonilas (nmol/mg prot)	1,9 \pm 0,2	1,9 \pm 0,5	2,1 \pm 0,6	0,618	2,4 \pm 0,6	2,0 \pm 0,7	1,8 \pm 0,8	0,014

TBARS = Thiobarbituric acid reactive substances

O teste post-hoc de Bonferroni mostrou que, tanto para TBARS como para Carbonilas nos hipertensos, as medidas iniciais foram semelhantes às pós-placebo e que as medidas pós-intervenção são estatisticamente menores. O teste de t de *Student* não pareado e mostrou que não há diferença significativa nos valores de TBARS ou de carbonilas entre os hipertensos e os

normotensos após a ingestão do extrato de frutas. Os gráficos 2 e 3 correspondem a ilustrações desses achados.

Gráfico 2– Quantificação do TBARS em indivíduos normotensos e hipertensos no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx). O teste post-hoc de Bonferroni mostra as diferenças significativas intragrupo: β : HEx versus HI $p < 0,001$; α : HEx versus HP $p = 0,033$.

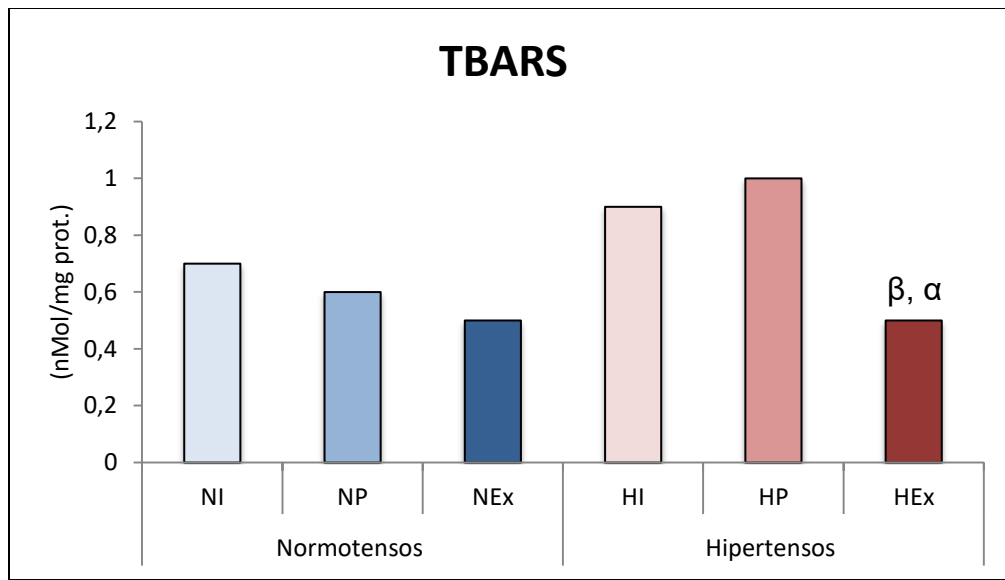
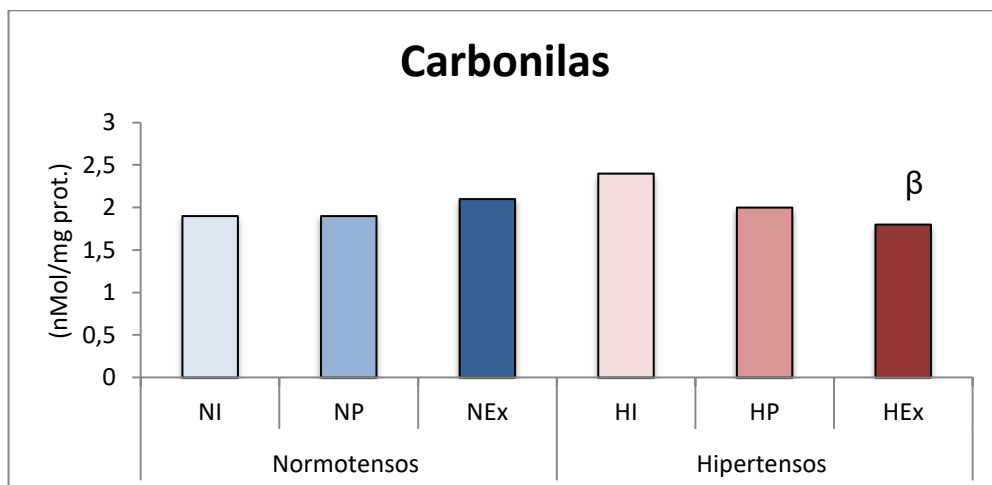


Gráfico 3 – Quantificação de Carbonilas em indivíduos normotensos e hipertensos no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx). O teste post-hoc de Bonferroni mostra as diferenças significativas intragrupos: β : HEx versus HI $p < 0,001$.



4.6.2 Avaliação de Marcadores de Capacidade Antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante representada pelas enzimas SOD e Catalase e também pelo FRAP, nos três tempos avaliados (inicial, pós-placebo e pós-extratos de frutas), aparece na Tabela 10.

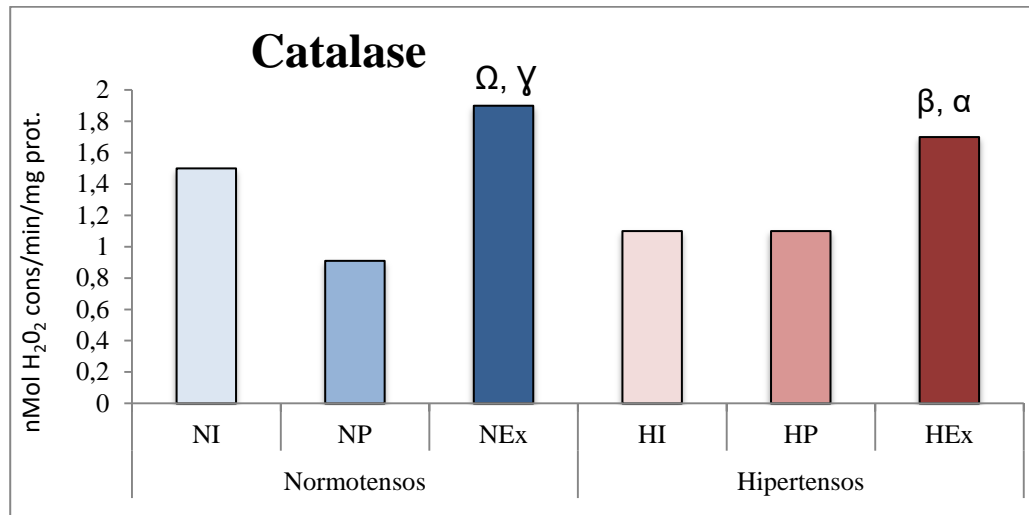
Tabela 10 – Avaliação da atividade das enzimas catalase e SOD e da capacidade antioxidante no plasma dos indivíduos normotensos (N) e hipertensos (H) no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx): Valores expressos como média \pm desvio padrão. A probabilidade de significância (p) da comparação intra grupo foi calculada pelo ANOVA de medidas repetidas.

	Normotensos				Hipertensos			
	NI	NP	NEx	P	HI	HP	HEx	p
Catalase (nmol H ₂ O ₂ cons/min/mg prot.)	1,5 \pm 1,1	0,91 \pm 0,5	1,9 \pm 1,4	0,003	1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,6	1,7 \pm 1,0	0,018
SOD (U/mg prot.)	3,2 \pm 0,5	3,1 0,4	3,5 \pm 1,3	0,135	3,0 \pm 0,5	3,2 \pm 1,0	3,0 \pm 0,6	0,847
FRAP (mM Fe (II)/L)	1,16 \pm 0,5	1,4 0,5	1,3 \pm 0,4	0,213	1,3 \pm 0,4	1,4 \pm 0,5	1,3 \pm 0,4	0,187

SOD = Superóxido dismutase; FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power.

Os resultados mostram que o consumo de cápsulas de frutas antioxidantes durante 4 semanas aumentou a catalase nos dois grupos. As análises intragrupo demonstram que os valores de catalase após a suplementação são diferentes do início do estudo e após o período placebo, demonstrando uma diferença significativa. Além disso, após a suplementação com antioxidantes o valor de catalase em indivíduos hipertensos e normotensos ficou semelhante.

Gráfico 4 – Quantificação de Catalase em indivíduos normotensos e hipertensos no início do estudo (NI e HI), após a ingestão de cápsulas com placebo (NP e HP) e com extrato de frutas (NEx e HEx). O teste post-hoc de Bonferroni mostra as diferenças significativas intragrupos: NEx versus NI $p=0,03$; Υ : NEx versus NP $p=0,005$; β : HEx versus HI $p=0,001$; α : HEx versus HP $p=0,001$



6. DISCUSSÃO

Nosso estudo estabelece evidências científicas que cápsulas contendo extrato de frutas conservam o poder antioxidante e tem efeito benéfico prevenindo a oxidação de lipídeos e proteínas nos hipertensos. Este efeito antioxidante observado aponta para o fato que a suplementação alimentar com cápsulas de extrato de frutas, de alguma maneira (e esse estudo não se propôs a estudar os mecanismos), interrompeu o ciclo vicioso que ocasiona o dano oxidativo a lipídios e proteínas no indivíduo hipertenso. Certamente, o aumento de atividade da enzima catalase (também observado neste estudo) está envolvido na diminuição do estresse oxidativo, graças à sua capacidade de neutralizar o peróxido de hidrogênio. Para além desse efeito eletroquímico, os dados aqui apresentados mostram uma redução da resistência à insulina após o consumo dos extratos de frutas. Esse é um efeito metabólico que aumenta a capacidade das células de captarem a glicose plasmática de modo a permitir a realização adequada das funções celulares e a diminuir o efeito de um dos pilares da síndrome metabólica.

O fato de ter ocorrido uma diminuição da oxidação proteica têm grande relevância em função de suas implicações, pois a carbonilação das proteínas afeta amplamente a função celular, podendo atingir enzimas, receptores e proteínas transportadoras de membrana, proteínas moduladoras da resposta imune e de provocar danos irreversíveis quando afeta enzimas reparadores do material genético. Além disso, as proteínas oxidadas podem contribuir para a

geração de danos secundários a outras biomoléculas (HALLIWEL e WHITEMAN, 2004).

O dano às proteínas é um processo complexo, que envolve 20 aminoácidos diferentes que podem sofrer a oxidação, de forma diferente e por várias espécies reativas. Os compostos gerados reagem entre si ou com o oxigênio. Nessa última, são geradas espécies reativas de oxigênio, os radicais peróxilas ($RO_2 \cdot$) que se convertem em radicais superóxidos ($O_2 \cdot^-$), e por meio de reações em cadeia produzem mais radicais livres, propagando e amplificando o processo (REYE et al., 2006).

Os extratos de frutas utilizados no nosso estudo comprovadamente continham compostos fenólicos, como mostrou a análise pelo método Folin-Ciocalteu. A extração dos compostos fenólicos a partir do extrato seco foi feita com diluição em metanol. Esse é um ponto importante a ser levado em consideração para comparação com os valores da literatura, uma vez que esse processo pode ser feito em metanol ou etanol ou acetona, com ou sem processamento em ultrassom ou micro-ondas. Assim sendo, os valores obtidos nos diferentes estudos raramente são comparáveis entre si (KLAVINS et al., 2017). Devido a este fato, as listas e relatórios divulgados por instituições de pesquisa são de grande ajuda para os nutricionistas, pois permitem a comparação entre diversas categorias de alimentos (temperos, frutas, verduras, etc.) em diferentes apresentações (crú, suco, extrato seco, etc). Nessas listas, todo o processo de determinação do conteúdo de polifenóis e da capacidade antioxidativa foi feito com os mesmos parâmetros de extração e quantificação (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010).

Com a ajuda da base de dados disponibilizada por HAYTOWITZ e BHAGWAT (2010) - Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods USDA - foi possível verificar que cápsula de mirtilo equivale a aproximadamente seis unidades da fruta *in natura*, a cápsula de cranberry tem a capacidade antioxidante semelhante a sete unidades da fruta e de romã equivale a aproximadamente metade de uma unidade pequena da fruta. Assim, é possível obter os benefícios aqui demonstrados com uma suplementação em pequena dose.

O fato de não termos usado doses maiores de extrato de frutas relaciona-se diretamente com ao problema da adesão à medicação. A baixa adesão ao tratamento medicamentoso em doenças crônicas é muito comum, entretanto na hipertensão é ainda mais acentuada uma vez que a maioria os indivíduos não apresenta sintomas da patologia (HORI e DA-SILVA, 2016). A quantidade de doses prescritas é um dos fatores que contribui para uma baixa adesão ao tratamento. No nosso caso, para garantir uma melhor adesão, decidiu-se por administrar 3 doses diárias. Para que pudéssemos alcançar uma dose significativa de extrato, as cápsulas tiveram que ser de tamanho grande (cerca 500mg). Seria possível aumentar o número de cápsulas administradas por dia (para aumentar a dose de antioxidante), entretanto a adesão seria comprometida. Desta maneira, optamos por uma dose menor diária, porém com maior garantia de consumo continuado ao longo das oito semanas. Outro fator que deve ser levado em conta é que, pelo menos para os indivíduos hipertensos, as cápsulas do nosso estudo se acrescentaram à medicação diária para o controle da hipertensão.

Obtivemos mais de 90% de adesão à suplementação, sendo que taxas de 80% podem ser consideradas aceitáveis (OSTERBERG, BLASCHKE, 2005). O sucesso da nossa intervenção pode ser atribuído a dois fatores. O primeiro deles foi a realização dos contatos telefônicos semanais como maneira de aproximar o paciente do pesquisador e acompanhar a adesão. O outro fator importante foi ter começado o estudo com a administração do placebo uma vez, o hábito de ingestão das cápsulas foi sendo incorporado à rotina dos participantes durante a fase placebo, de modo a prevenir o baixo consumo das cápsulas do extrato de frutas.

Uma limitação do nosso estudo é que a dose de antioxidantes é relativamente baixa. A concentração de polifenóis depende do processamento ao qual foi submetido o alimento. Muitos sucos de frutas comercializados são filtrados para produzir um líquido sem sedimentos. Com isso, retiram-se as fibras e a quantidade de polifenóis presentes na bebida (KLAVINS et al., 2017). Embora, a bebida contenha maior concentração de polifenóis quando não é filtrada, do ponto de vista comercial não é interessante. Por esse motivo, optamos pela indicação de consumo de cápsulas com o extrato seco da fruta, como um modo de manter com maior integridade as propriedades antioxidantes da fruta.

Que seja do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo utilizando cápsulas de extrato de frutas. Assim sendo, é difícil comparar nossos dados com aqueles existentes na literatura. Mesmo quando são utilizadas apresentações como sucos, frutas congeladas ou frutas secas, fica difícil estabelecer comparações uma vez que o processamento difere bastante entre os estudos (KLAVINS et al., 2017).

Além dos benefícios que trazem à saúde, os polifenóis têm sido estudados pela sua capacidade de preservar por mais tempo a comida processada pela indústria alimentícia e pelos distribuidores de alimentos *in natura*. Controlar os processos de oxidação é o objetivo principal para prolongar a estabilidade e o tempo de armazenamento dos alimentos. Os antioxidantes artificiais são potencialmente cancerígenos e, por isso, tem uso limitado. Nesse sentido, há um grande empenho na pesquisa para aproveitamento de produtos de descarte de frutas ricas em polifenóis para utilização como agentes antioxidantes (DUDA-CHODAK e TARKO, 2007). Por exemplo, no caso do mirtilo, do cranberry e da romã, após o processamento para retirada do suco, restam os bagaços e as sementes, ambos muito ricos em polifenóis, que podem ser usados para produção de cápsulas contendo extratos das frutas.

Em um estudo clássico, LOPES e colaboradores (2003) observaram uma redução nos níveis de pressão arterial em indivíduos hipertensos obesos seguindo uma dieta padrão DASH, com 4 a 5 porções de frutas por dia. A nossa proposta de suplementação com extrato de frutas é limitada em comparação com o uso da dieta DASH e essa limitação pode ter sido responsável pelo fato de que não observamos alteração nos níveis pressóricos nos hipertensos. A dieta DASH é padrão ouro para prevenção e tratamento da hipertensão arterial. A combinação de alimentos presente na dieta DASH é superior quando comparada à suplementação apenas com cápsulas de frutas quando o objetivo é reduzir níveis pressóricos.

Além disso, deve-se levar em conta há polifenóis com maior especificidade para controlar a hipertensão, como é o caso da quercetina

presente no mirtilo (JOHNSON et al., 2015). É interessante observar que a modificação estrutural que ocorre nos polifenóis durante o processamento do alimento altera a sua capacidade antioxidante: suplementação com cápsulas de vinho reduziu a PA enquanto que cápsulas de suco de uva não tiveram efeito semelhante (DRAIJER et al., 2015).

Os índices antropométricos utilizados no presente estudo foram peso, altura, circunferência da cintura, circunferência do pescoço e IMC. Todas essas medidas foram realizadas para avaliação clínica do risco metabólico associado à adiposidade corporal, sendo medidas fáceis, simples, práticas e não invasivas.

A medida da circunferência da cintura (CC) é uma forma de avaliar a adiposidade visceral. É interessante observar que, as mulheres desta casuística (normotensas e hipertensas) têm risco aumentado de doença cardiovascular, já que acima de 80 cm risco e acima de 88 cm risco aumentado. Para homens, o risco está associado a valores maiores que 94 cm e o risco aumentado aparece acima de 102 cm. Os homens hipertensos apresentaram de CC próximos a 100cm, portanto abaixo da faixa de risco aumentado e os homens normotensos estão na faixa limítrofe de risco cardiovascular (por volta de 94cm) (LEAN et al., 1995).

A circunferência cervical (Ccerv) é uma medida mais simples e prática em relação à circunferência da cintura e não sofre influência da distensão abdominal pós-prandial ou movimentos respiratórios (BEN-NOUN, 2001). O aumento da circunferência cervical está associado com a gordura visceral abdominal. O consumo do extrato de frutas não resultou em redução da CCerv.

A inflamação é um fenômeno normal de qualquer organismo em resposta à injúria traumática, química ou por patógenos. O processo inicia-se com a migração das células inflamatórias do sangue para os tecidos e liberação dos mediadores citocinas. A formação de radicais reativos de oxigênio e de nitrogênio constitui uma importante linha de defesa, uma vez que essas substâncias têm capacidade para eliminar patógenos. O sofrimento do organismo se instala quando o processo inflamatório deixa de ser limitado no tempo e no espaço, passando a ter um caráter sistêmico, com níveis aumentados de citocinas e radicais livres circulantes e por tempo prolongado (DINH, 2014).

Há muito se conhece que os antioxidantes presentes nas frutas afetam as funções das células inflamatórias, geralmente inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação celular. Assim sendo, os flavonoides são reconhecidos como imunomoduladores (MIDDLETON e KANDASWANI, 1992).

Foi por esse motivo que optamos por avaliar os níveis de PCR, Interleucinas -2,-4,e -6, TNF-alfa, MCP1, adiponectina e leptina como indicativo do status inflamatório do organismo. No presente estudo, não obtivemos diferenças significativas após a intervenção. Esse resultado não surpreende, tendo em vista que todos os participantes moravam na Região Metropolitana de São Paulo. Desta forma, esses indivíduos estão expostos a níveis altos de poluição atmosférica que, sabidamente, é responsável pela indução de uma inflamação subclínica permanente no organismo. Tentar modular este estado inflamatório dos indivíduos expostos à poluição apenas com suplementação alimentar é um objetivo muito difícil de ser atingido. Acrescente-se a isso, as

evidências de que a inflamação causada pela exposição atmosférica aumenta os radicais livres circulantes e o risco de morte por causa respiratória e cardiovascular (FAJERSZTAJN et al., 2017).

Mais ainda, os resultados de estudos epidemiológicos dos efeitos de polifenóis nos marcadores inflamatórios, em seres humanos, são controversos, porque a quantidade de polifenóis ingerida na alimentação habitual pode variar grandemente entre os indivíduos além de ser um parâmetro de difícil controle e acompanhamento. Para contornar essa dificuldade, são necessários estudos com um grande número de participantes. Por exemplo, em um estudo multicêntrico, internacional, com 315 participantes sem doenças crônicas associadas, observou-se que níveis mais baixos de polifenóis ativos estão associados a níveis maiores de PCR no plasma e vice-versa, indicando uma relação inversamente proporcional entre marcadores inflamatórios e polifenóis (HARMS, 2019).

A literatura aponta para o fato que certos flavonoides tem um papel na regulação da glicose por aumentar a secreção de insulina (EHRENKRANZ et al., 2005; FRAGA et al., 2019). No presente estudo, não foi possível corroborar esses dados, pois não detectamos aumento na insulina plasmática após o consumo de extratos e frutas. No entanto, quando utilizamos a glicemia e a insulinemia para o cálculo do HOMAIR (índice que reflete a resistência à insulina) houve uma queda da resistência à insulina nos dois grupos após o consumo de extratos de frutas.

O teste escolhido para avaliação da resistência à insulina foi o HOMAIR por apresentar boa correlação com exames considerados padrão ouro como o *clamp* hiperinsulinêmico (MATTHEWS et al., 1985).

Avaliar a atividade enzimática traz evidências de resposta imediata do organismo ao estresse oxidativo. Embora a enzima SOD seja importante para avaliação do estresse oxidativo, nossos resultados corroboram aquele de RISO e colaboradores (2013) que realizaram suplementação de suco de mirtilo em homens adultos nos quais também não houve alteração de SOD após seis semanas de intervenção.

O aumento da catalase nos dois grupos confirma um aumento de substâncias antioxidantes no plasma. Uma pesquisa com suplementação de 500g de morangos frescos em voluntários saudáveis também demonstrou aumento da capacidade antioxidante (medidos por um melhor resultado no teste de FRAP e de ORAC) após um mês de ingestão das frutas (ALVAREZ et al.,2014).

A atividade humana provocou uma extrema degradação ambiental e a poluição da água, do solo e do ar afeta a maior parte da população mundial. Essas alterações afetam negativamente a capacidade antioxidante do organismo, seja por gerarem radicais livres reativos ou por promoverem a sua formação. Assim sendo, para prevenir a ação deletéria desses compostos é necessário aumentar o consumo de antioxidantes pela alimentação.

É urgente a implementação de políticas públicas que contemplem programas de fomento ao consumo de frutas e vegetais *in natura* como prevenção a doenças relacionadas ao aumento do estresse oxidativo no organismo, uma vez que o animal não é capaz de produzir antioxidantes potentes como os flavonoides. Essa medida é a mais adequada e, ao mesmo tempo, a mais desafiadora, devido à resistência a mudança de hábitos

alimentares, a dificuldade de acesso, transporte e armazenamento das frutas e verduras.

7. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo mostram que com a suplementação de extratos de cranberry, mirtilo e romã foram possíveis reduzir a resistência à insulina em pacientes hipertensos e voluntários normotensos e ainda apresentou um impacto na diminuição do estresse oxidativo, por meio da maior atividade da enzima catalase e redução da peroxidação lipídica e do dano oxidativo às proteínas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Ghani MA¹, Jenkinson CP, Richardson DK, Tripathy D, DeFronzo RA. Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study. *Diabetes*. 2006;55(5):1430-5.
- Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, González-Paramás AM, et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014;25(3), 289–294.
- Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Hashemi M, Rafieian-Kopaei M. Clinical investigation of the acute effects of pomegranate juice on blood pressure and endothelial function in hypertensive individuals. *ARYA Atheroscler*. 2013; 9 (6): 326-31.
- Asgary S, Sahebkar A, Afshani MR, Keshvari M, Haghjooyjavanmard S, Rafieian-Kopaei M. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endothelial function improving, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. *Phytother Res*. 2014;28(2):193-9.
- Association of Official Analyst Chemists. *Official methods of analysis*. Washington, DC, 1995. v.2.
- Barbosa KBF, Costa, NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minin VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr*; 2008; 33(2): 111-128.
- Basu A, Du M, Leyva MJ, Sanchez K, Betts NM, Wu M, et al. Blueberries Decrease Cardiovascular Risk Factors in Obese Men and Women with Metabolic Syndrome. *The Journal of Nutrition*. 2010;140(9):1582-1587.

- Ben-Noun L, Sohar E, Laor A. Neck circumference as a simple screening measure for identifying overweight and obese patients. *Obes Res.* 2001;9(8):470-7.
- Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999; 299:15-27.
- Blumenthal JA, Babyak MA, Hinderliter A, Watkins LL, Craighead L, Lin PH, et al. Effects of the DASH diet alone and in combination with exercise and weight loss on blood pressure and cardiovascular biomarkers in men and women with high blood pressure: the ENCORE study. *Arch Intern Med.* 2010; 170:126– 135.
- Boveris A, Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen *Biochem J.* 1973; 134(3): 707–716.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1988; 56:317-333.
- Buege JA, Aust S. Microsomal lipid oxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-10.
- Carocho M; Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 51, 15-26.
- Cao G, Alessio HM, Culter R. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 1993; V. 14, p. 303-311.

- Côté J, Caillet S, Doyon G, Sylvain JF, Lacroix M. Bioactive Compounds in Cranberries and their Biological Properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010; 50:7, 666-679.
- Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. www.OpenEpi.com, updated 2013/04/06.
- Departamento de Informática em Saúde, Escola Paulista de Medicina/Unifesp. Tabela de Composição Química dos Alimentos – aplicativo com dados da U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2012. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25.
- Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int*. 2014;2014:406960.
- Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. Organização José Egídio Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior, Sérgio Vencio. -- São Paulo: Editora Clannad, 2017
- Dohadwala MM, Holbrook M, Hamburg NM, Shenouda SM, Chung WB, Titas M, et al. Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93: 934–940.
- Draijer R, Graaf Y, Slettenaar M, Groot E, Wright CI. Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects. *Nutrients*. 2015; 7: 3138-3153.
- Duda-Chodak A, Tarko T. Antioxidant properties of different fruit seeds and peels. *Acta Scientiarum Polonorum : Technologia Alimentaria*. 2007; 6: 29-36.
- Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 Jan-Feb;21(1):31-8.
- Elks CM, Reed SD, Mariappan N, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK, et al. A Blueberry-Enriched Diet Attenuates Nephropathy in a Rat Model of Hypertension via Reduction in Oxidative Stress. *PLoS ONE*. 2011; 6(9): e24028.

- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med.* 2013; 368:1279–90.
- Fajersztajn L, Saldiva P, Pereira LAA, Leite VF, Buehler AM. Short-term effects of fine particulate matter pollution on daily health events in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *Int J Public Health.* 2017; 62(7):729-738.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB.* 1997; 43(1):61-8.
- Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ. *Food Chem.* 2011; 127(2):807-21.
- Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA.. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* 2019 Feb 20;10(2):514-528.
- Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23(14):1144-70.
- Geloneze B; BRAMS INVESTIGATORS et al. Índices HOMA1-IR e HOMA2-IR para identificação de resistência à insulina e síndrome metabólica: Estudo Brasileiro de Síndrome Metabólica (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metab .* 2009; 53: 281-287.
- Guia alimentar para a população brasileira. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Ministério da Saúde. 2. ed., Brasília 2014.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(2):231-55.
- Harms L, Scalbert A, Zamora-Ros R, Sabina R. Plasma polyphenols associated with lower high-sensitivity C-reactive protein concentrations: a cross-sectional

- study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *British Journal of Nutrition*, 2019 1-35
- Hussain T, Tan B, Yin Y et al.. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev* 2016. Article ID 7432797.
- Haytowitz DB, Bhagwat S: USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. U.S. Department of Agriculture. 2010. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>.
- Heinonen M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - a Finnish perspective. *Mol Nutr Food Res*.2007; 51(6):684-91.
- Hori PC, da Silva GV. Adherence to antihypertensive treatment: approach, measurement methods and strategies for good outcomes *Rev. bras. hipertens* 2016; 23(4): 84-89.
- Johnson SA, Figueroa A, Navaei N, Wong A, Kalfon R, Ormsbee LT, et al. Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2015; 115 (3): 369-377.
- Klavins L, Kvišis J, Klavins M. Comparison of methods of extraction of phenolic compounds from american cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.) press residues. *Agronomy Research*. 2017; 15: 1316-1329.
- Kocelak P, Chudek J, Olszanecka-Glinianowicz M. Prevalence of metabolic syndrome and insulin resistance in overweight and obese women according to the different diagnostic criteria. *Minerva Endocrinol*. 2012;37(3):247-54.
- Kumar S; Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, ID 162750, 16 pages.
- Lean MEJ, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight mangement. *BMJ* 1995; 311: 158-61.
- Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-

- enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(2):153-8.
- Lopes HF, Corrêa-Giannella ML, Consolim-Colombo FM, Egan BM. Visceral adiposity syndrome. *Diabetol Metab Syndr.* 2016; 8:40.
- Lopes HF, Martin KL, Nashar K, Morrow JD, Goodfriend TL, Egan BM. DASH diet lowers blood pressure and lipid-induced oxidative stress in obesity. *Hypertension.* 2003; 41(3):422-30.
- Lopes HF, Silva HB, Consolim-Colombo FM, Barreto Filho JA, Riccio GMG, Giorgi DMA, et al. Autonomic abnormalities demonstrable in young normotensive subjects who are children of hypertensive parents. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2000; 33:51-4.
- Lynn A, Hamadeh H, Leung WC, Russell JM, Barker ME. Effects of pomegranate juice supplementation on pulse wave velocity and blood pressure in healthy young and middle-aged men and women. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012; 67(3):309-14.
- Magder, S. "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" *Critical Care*, 10, 208. 2006.
- Malachias MVB, Souza WKSB, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107(3 Supl.3):1-83.
- Marklund, S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47, 469-474, 1974.
- Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:6501046.
- Matthews D, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Trecher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-9.

- Medina-Remon A, Tresserra-Rimbau A, Pons A, Tur JA, Martorrel M, Ros E, et al. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015; 25: 60-67.
- Michalska A, Lysiak G. Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(8):18642-18663.
- Middleton E Jr, Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol*. 1992 Mar 17;43(6):1167-79.
- Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. 2010; Database, doi: 10.1093/database/bap024
- Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.
- Novotny JA, Baer DJ, Khoo C, Gebauer SK, Charron CS. Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. *J Nutr*. 2015; 145 (6):1185-93.
- Osterberg L, Blaschke T. Adherence to medication. *N Engl J Med*. 2005 Aug 4;353(5):487-97.
- Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010; 64: S112–S120.
- Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging*. 2007; 2: 219-236.
- Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 357-363.
- Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo' C, Martini D, Campolo J, Vendrame S, et al. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on

- markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur J Nutr.* 2013; 52:949–961.
- Reyes GC, Sánchez IR, Calzada-Mendoza CC, Olivares-Corichi IM. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 2006 Octubre-Diciembre 14, (4):233-236.
- Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol.* 2013; 3(1):1-58.
- Rosenblat M, Volkova N, Attias J, Mahamid R, Aviram M. Consumption of polyphenolic-rich beverages (mostly pomegranate and black currant juices) by healthy subjects for a short term increased serum antioxidant status, and the serum's ability to attenuate macrophage cholesterol accumulation. *Food Funct.* 2010;1(1):99-109.
- Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet: DASH Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 2001; 344:3-10.
- Sales ARK, Silva BM, Neves FJ, et al. Diet and exercise training reduce blood pressure and improve autonomic modulation in women with prehypertension. *Eur J Appl Physiol.* 2012; 112: 3369.
- Santos AM, RASEIRA MCB. O cultivo do mirtilo. - Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 17p.
- Seeram NP, Aronson WJ, Zhang Y, Henning SM, Moro A, Lee RP, et al. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J Agric Food Chem.* 2007; 19;55(19):7732-7.
- Stull AJ, Cash KC, Champagne CM, Gupta AK, Boston R, Beyl RA, et al. Blueberries improve endothelial function, but not blood pressure, in adults with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients.* 2015; 27;7(6):4107-23.

- Teles YCF, Monteiro RP, Oliveira MS, Ribeiro-Filho J. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. *J Health Sci Inst.* 2015;33(1):89-93.
- Valko M, Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 266: 37-56.
- VIGITEL Brasil 2018. Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel 2018). Ministério da Saúde, 2019.
- Vinson JA, Bose P, Proch J, Al Kharrat H, Samman N. Cranberries and cranberry products: powerful in vitro, ex vivo, and in vivo sources of antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2008 Jul 23;56(14):5884-91.
- Wesseling KH, Wit B, van der Hoeven GMA, van Goudoever J, Settels JJ. Physical, calibrating finger vascular physiology for Finapres. *Homeostasis.* 1995; 36: 67-82.
- Wesseling KH. A century of non-invasive arterial pressure measurement: from Marey to Finapres. *Homeostasis.* 1995; 36: 50-66.
- WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
- World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva. World Health Organization, 2002
- World Health Organization (WHO). Nutrition Unit. (2003) .Fruit and vegetable promotion initiative: a meeting report. Geneva, 25–27 August 2003.

9. ANEXO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Efeito da suplementação de antioxidantes sobre o balanço autonômico.
2. PESQUISADOR EXECUTANTE: Ludmila Nogueira Novaes
CARGO/FUNÇÃO: Nutricionista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40850
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Heno Ferreira Lopes
CARGO/FUNÇÃO: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 51966
UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Hipertensão
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

O senhor (a) está sendo convidado a participar desta pesquisa que tem por objetivo avaliar a ação da suplementação de antioxidantes (extratos de diferentes frutas) sobre o efeito cardiovascular em especial sobre a hipertensão.

1. Os participantes dessa pesquisa serão triados a partir do ambulatório de hipertensão do Instituto do Coração (InCor) e os voluntários normais serão convidados por contato direto ou via telefone.

2. Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), caso o senhor (a) concorde voluntariamente a participar da pesquisa, será realizada avaliação clínica e laboratorial.

3. Após a avaliação clínica e laboratorial (coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço) os participantes do estudo serão distribuídos para 2 diferentes grupos: Grupo A (normotensos) e Grupo B (hipertensos). Os participantes da pesquisa **serão selecionados** para receber suplementação na forma de cápsulas com antioxidantes ou cápsulas com placebo (substância não ativa) durante 4 semanas. As cápsulas para suplementação antioxidante serão de blueberry, cranberry e romã, sendo uma cápsula de cada ao dia. As cápsulas são da empresa CháMais Produtos Naturais@ (Xanxerê, Santa Catarina, Brasil). Após um intervalo de 4 semanas o grupo que recebeu a suplementação receberá o placebo e o grupo placebo receberá a suplementação antioxidante (crossover), ambos durante 4 semanas. Todos os testes serão realizados no início do estudo, após 4 semanas de intervenção e após a 8 semanas de intervenção.

4. As cápsulas são feitas de extratos de frutas, não apresentando contraindicação. A coleta de sangue será realizada por profissional qualificado para tal função, com material devidamente higienizado a fim de apresentar risco físico mínimo para o paciente.

5. Não há benefício direto para o participante do estudo. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que a suplementação de antioxidantes tenha efeito redutor nos níveis de pressão arterial. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

6. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Heno Ferreira Lopes, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, nº 44 – Unidade de Hipertensão; Cerqueira César, CEP 05403-900 – São Paulo/ SP. Telefone 26615084. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – teu: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br .

7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

8. Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

9. O armazenamento do material será realizado até o término da pesquisa, após a amostra será descartada.

10. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

11. Os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

12. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o Dr. Heno Ferreira Lopes e Ludmila Nogueira Novaes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. **Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.**

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____