



## **Dissertação de Mestrado**

**VINHO TINTO, SUCO DE UVA E ETANOL EM RATOS ADULTOS  
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPIDÊMICA**

---

**Guilherme Barcellos de Moura**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**VINHO TINTO, SUCO DE UVA E ETANOL EM RATOS ADULTOS  
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPIDÊMICA**

---

**por**

**Guilherme Barcellos de Moura**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção  
do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de  
Mestrado

**VINHO TINTO, SUCO DE UVA E ETANOL EM RATOS ADULTOS  
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPIDÊMICA**

elaborada por  
**Guilherme Barcellos de Moura**

como requisito parcial para a obtenção de grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Neidi Garcia Penna**  
(Presidente/ Orientadora)  
(UFSM)

---

**Melânia Palermo Manfron**  
(UFSM)

---

**Leila Picolli da Silva**  
(UFSM)

Santa Maria, 04 de março de 2009

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus pais, Luis Eduardo e Ana Lucia, por me ensinarem a importância da família unida, do amor fraterno, das verdadeiras amizades, do certo e errado. Obrigado por toda a dedicação e carinho durante todos esses anos. Obrigado pelo apoio em todas as decisões difíceis e por acreditarem sempre.

Aos meus irmãos, Daniel e Alexandre, por estarem sempre prontos para tudo: um abraço apertado, uma risada, um jogo de futebol, conselhos e críticas.

À Andressa, pelo amor incondicional, pela confiança depositada em mim. Obrigado por toda a ajuda neste trabalho, sem você nada disso seria possível. Agradeço pela companhia nos momentos de tristeza e de alegria.

Às professoras Neidi e Leila, por aceitarem este desafio confiando em minha capacidade e auxiliando em todos os momentos na construção desse trabalho. Às professoras Luisa e Melânia, pela disponibilidade de lerem esta dissertação.

Às colegas Tiffany e Anne pelo apoio durante a realização de minhas atividades.

Ao pessoal do NIDAL. Aos amigos Marialeni e Moisés dos laboratórios do nosso departamento, pelo carinho e paciência.

À Celso Dal Molin, por fornecer gentilmente as amostras de vinho tinto e suco de uva da marca Dal Pino, tornando possível este estudo.

À CAPES, pelo financiamento. À Doles, por fornecer reagentes e à Pantec Tecnologia, pela doação de gema de ovo desidratada em pó.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira tornaram possível a realização deste trabalho.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

AUTOR: Guilherme Barcellos de Moura  
ORIENTADORA: Neidi Garcia Penna  
CO-ORIENTADORA: Luisa Helena Rychecki Hecktheuer  
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 04 de Março de 2009

A proteção contra as doenças associadas com estresse oxidativo, como câncer, diabetes, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares têm recebido atenção especial nos últimos anos. Trabalhos anteriores indicam que dietas ricas em colesterol induzem ao estresse oxidativo e à hipercolesterolemia em ratos. Algumas substâncias da dieta como os polifenóis encontrados em vinho e suco de uva têm demonstrado serem antioxidantes potentes, agindo como seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais e moduladores enzimáticos. Assim, este trabalho foi conduzido para avaliar os efeitos de vinho tinto, suco de uva e etanol em ratos Wistar adultos alimentados com uma dieta enriquecida com gema de ovo. Os animais foram tratados diariamente com duas dietas hipercalóricas contendo 0% e 0,627% de colesterol, respectivamente e submetidos a doses moderadas de vinho tinto, suco de uva e etanol por 35 dias. Experimentalmente, o vinho tinto, o suco de uva e o etanol preveniram parcialmente a peroxidação lipídica e restauraram o conteúdo de tióis não-protéicos dos animais tratados com dieta rica em colesterol. A avaliação histológica do fígado dos ratos indicou que somente o suco de uva, dentre todas as bebidas utilizadas, reduziu o dano nas células hepáticas e melhorou significativamente a histomorfologia do fígado. Concluindo, podemos dizer que o suco de uva é uma excelente alternativa ao vinho tinto neste modelo experimental de dieta enriquecida com colesterol em ratos adultos.

**Palavras-chaves:** estresse oxidativo, ratos Wistar, polifenóis e colesterol.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduate Course in  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

AUTHOR: Guilherme Barcellos de Moura

ADVISOR: Neidi Garcia Penna

CO-ADVISOR: Luisa Helena Rychecki Hecktheuer

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, March 2009

Special attention has been focused on protection against diseases associated with oxidative stress such as cancers, diabetes, cardiovascular diseases, aging and neurodegenerative disease in the last years. Previous reports indicate that high-cholesterol diets induced oxidative stress and hypercholesterolemia in rats. Some dietary compounds such as polyphenols found in red wine and grape juice have demonstrated to be potent antioxidants, behaving as ROS scavengers, metal chelators and enzyme modulators. Therefore, this study was conducted to evaluate the effects of red wine, grape juice and ethanol in adult Wistar rats fed with an egg yolk enriched diet. Animals were treated daily with two hypercaloric diets containing 0% and 0,627% cholesterol, respectively and submitted to red wine, grape juice and ethanol moderated doses for 35 days. Experimentally, red wine, grape juice and ethanol partially prevented lipid peroxidation and restored non-proteic thiols content of high cholesterol treated animals. Liver histology assessment indicated that only grape juice, among all beverages, reduced hepatic cell damage and improved histomorphology of the liver similar to cholesterol untreated rats. Conclusively, we can suggest that grape juice is excellent alternative to red wine in this experimental model of adult rats fed with high cholesterol diet.

**Keywords:** oxidative stress, Wistar rats, polyphenols, cholesterol.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1-** Ácidos presentes em vinhos.....13

### ARTIGO CIENTÍFICO

**Figure 1:** Effects of cholesterol, ethanol, grape juice and red wine on TBARS (A), NPSH (B) and Vitamin C (C) levels in liver of rats treated for 35 days.....37

**Figure 2:** Liver from rats H and E, stain, (A,C,E,G,I x 100) and (B,D,F,H,J x 400)...38

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO

**Table 1** - Modified formulations of AIN-93M diet for maintenance of adult rodents...36

**Table 2** - Effect of different diets on food consumption, body weight gain and organs weights of rats.....36

**Table 3** - Effect of different diets and liquids on cholesterol, triglycerides, LDL, HDL, glucose, uric acid and total protein plasmatic levels of rats.....37



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância  
CAT – catalase  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
ERNs – espécies reativas de nitrogênio  
GPx – glutathione peroxidase  
GSH – glutathione reduzida  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
LDL – lipoproteína de baixa densidade  
HDL – lipoproteína de alta densidade  
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade  
IDL – lipoproteína de densidade intermediária  
DM – Diabetes Mellitus  
MDA - malondialdeído  
NPSH – tióis não-protéicos  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – superóxido  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – oxigênio singlete  
S.E. – erro médio padrão  
SOD – superóxido dismutase  
TBA – ácido tiobarbitúrico  
TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
S.D. – desvio padrão  
ROS – reactive oxygen species  
DPPH – 1,1- difenil-2-picrihidrazila

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Vinho.....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Composição do Vinho.....	12
<b>2.2 Suco de uva.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Etanol.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Lipídios.....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Gema de ovo.....	18
<b>2.5 Estresse oxidativo x Hipercolesterolemia.....</b>	<b>19</b>
<b>2.6 Compostos fenólicos e seus efeitos antioxidantes.....</b>	<b>21</b>
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Effects of red wine, grape juice and ethanol in adult rats fed with hyperlipidemic diet .....</b>	<b>24</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O vinho tinto é uma bebida que pode exercer amplo espectro de ações para a promoção da saúde, tanto em humanos quanto em animais de laboratório, se consumido moderadamente. Muitos estudos têm sugerido que o consumo de vinho tinto está associado com a redução no risco de doenças coronárias e do câncer (Hertog et al., 1993; Romero-Perez et al., 1999).

Os vinhos tintos são fontes ricas em compostos fenólicos e estes exercem uma potente atividade antioxidante ao inibir a oxidação da LDL humana *in vitro* (Frankel et al., 1993; Kanner et al., 1994), o que está relacionada com suas propriedades quelante de metais e seqüestrador de radicais livres (Bors & Saran, 1987).

O suco de uva é apontado como alternativa não alcoólica para o vinho tinto, e disponível para uma faixa mais ampla da população. Da mesma forma, Folts (1997) e Osman et al. (1998) demonstraram que seu consumo reduziu a agregação plaquetária, o que em parte pode prevenir doenças coronárias. Em estudos recentes, o suco de uva demonstrou inibir a oxidação da LDL e agir como relaxante do endotélio (Stein et al., 1999).

Adicionalmente, evidências epidemiológicas de muitos estudos apóiam a hipótese de que o consumo moderado de álcool está significativamente associado com uma redução da mortalidade por doenças cardiovasculares (Rimm et al., 1991; Groenback et al., 1994).

Sabe-se que dietas ricas em colesterol induzem a super produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem iniciar um processo de peroxidação lipídica (Tolins, Stone & Raji, 1992; Martinet et al., 2001). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que ratos submetidos a dietas ricas em colesterol tiveram um aumento significativo nos níveis de estresse oxidativo e uma indução de hipercolesterolemia (Montilla et al. , 2006).

Em trabalho semelhante, os autores Montilla et al. (2004a) verificaram que essas dietas também induzem mudanças nos níveis de ácidos biliares e no metabolismo do colesterol, além de induzir estresse oxidativo no plasma e fígado. Por isso, tem sido dada atenção especial na proteção contra doenças associadas

com estresse oxidativo, como câncer, diabetes, envelhecimento, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Montilla et al., 2004b). Ainda, pode-se considerar que a gema de ovo como fonte de colesterol alimentar provoca alterações arteriais e nos níveis plasmáticos de colesterol equivalentes às aquelas provocadas pelo colesterol purificado comercial quando fornecido em baixa dosagem (Jaldin et al., 2006). Por conseguinte, a eficácia de diferentes agentes e nutrientes para prevenir ou reverter os danos induzidos por uma dieta rica em colesterol têm sido investigados.

Considerando o exposto acima, este trabalho visou estudar os efeitos de compostos fenólicos e etanol em vinho tinto, comparando-os com os possíveis benefícios proporcionados por suco de uva e etanol, isoladamente, como resposta ao consumo de dieta hiperlipídica.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vinho

O vinho é o produto obtido exclusivamente pela fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas, ou não, ou de mostos de uvas. Esta é a definição adotada pela União Européia. Uma definição mais enológica seria a seguinte: “O vinho é a bebida proveniente da fermentação pelas células de leveduras, e também em certos casos pelas células das bactérias lácticas, do sumo do esmagamento ou maceração das células das uvas” (Peynaud, 1982).

#### 2.1.1 Composição do Vinho

O vinho é uma bebida complexa. Entre várias substâncias, este contém água, açúcares, ácidos, álcoois e compostos fenólicos (Koes, Quattrocchio & Mol, 1994).

Como constituinte químico predominante de uvas e vinhos, a água possui função crucial estabelecendo características básicas como solubilidade, viscosidade, etc. Ainda, a água é essencial em muitas das reações químicas envolvidas no desenvolvimento da uva, na fermentação do mosto e no envelhecimento do vinho (Jackson, 1994).

Conforme Vogt et al. (1986), o conteúdo de água da uva oscila entre 780 e 850g/L, dependendo das características climáticas da safra, da variedade da uva e do grau de maturação desta. No mosto há em média 800g/L, que serve como meio de dissolução de açúcares, ácidos e outras substâncias.

Os álcoois presentes no vinho são muitos, sendo os mais importantes o etanol, o metanol e álcoois superiores. O etanol é o produto principal da

fermentação alcoólica sendo formado pela transformação dos açúcares do mosto. No vinho, indica o teor alcoólico, contribui na formação de “corpo” e ressalta alguns aromas.

O metanol resulta da hidrólise de pectinas naturais presentes nas uvas. Isto se comprova pelo fato de que o conteúdo de metanol é maior quando enzimas pectinolíticas são adicionadas ao mosto, em vinhos fermentados em contato com a casca, e em vinhos feitos com uvas maceradas comparados àqueles de uvas não-maceradas (Flanzy & Loesel, 1958 apud Amerine & Joslyn, 1970).

Os álcoois superiores são produtos secundários da fermentação e respondem por grande parte dos aromas de um vinho. A produção de álcoois superiores ocorre através de transformações dos aminoácidos pela ação de leveduras e também por meio da fermentação de carboidratos por bactérias (Windisch, 1906 apud Amerine & Joslyn, 1970).

O vinho apresenta inúmeros ácidos em sua composição, predominando tartárico e málico. Os ácidos presentes no vinho se encontram na figura 1.

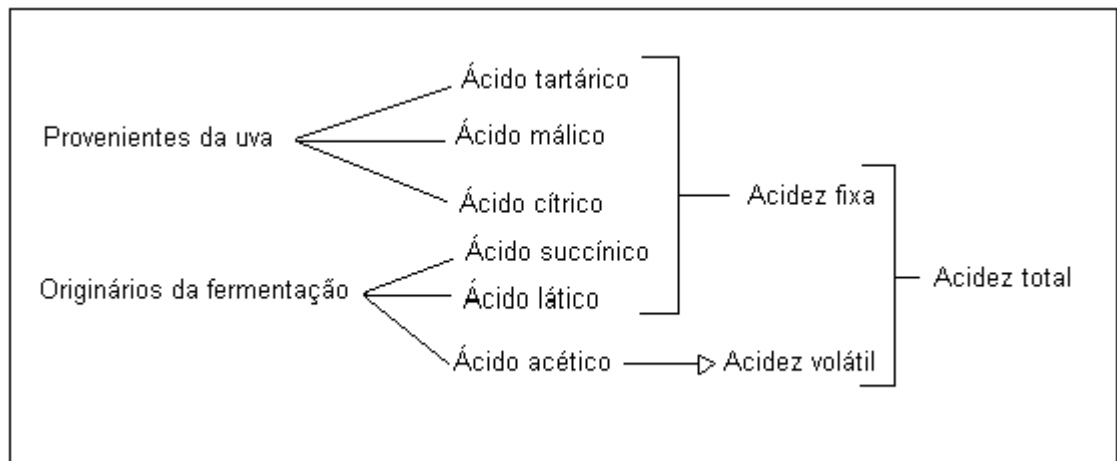


Figura 1. Ácidos presentes em vinhos (Peynaud, 1982).

A acidez é uma das características gustativas mais importantes dos vinhos e influencia sua estabilidade e coloração. Devido à insolubilização do ácido tartárico sob a forma de sais, a acidez titulável e o pH podem ser alterados durante a vinificação de acordo com o teor de potássio da uva (Rizzon & Miele, 2001).

A uva contém de 15 a 25% de açúcares, compostos de glicose e de frutose. No fruto maduro, estes dois açúcares se encontram em quantidades

semelhantes, porém, durante a fermentação esta relação altera-se, pois as leveduras fermentam mais a glicose. Assim, o açúcar que fica em maioria no fim da fermentação é a frutose (Peynaud, 1982). A uva contém ainda uma pequena quantidade de açúcares não fermentescíveis, que se encontram, portanto, no vinho. São as pentoses, arabinose e xilose.

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (Shahidi & Naczk, 1995). Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos (Malacrida & Motta, 2005).

O vinho tinto contém fenólicos derivados do envelhecimento em madeira e das leveduras, juntamente com grandes quantidades de componentes fenólicos que se originam das uvas, particularmente das cascas, as quais são retiradas durante a vinificação em branco (Singleton, 1982 apud Burns et al., 2000). Segundo Burns et al. (2000), embora estruturalmente diversos, os compostos fenólicos são classificados em dois grupos: os flavonóides e os não-flavonóides.

A família dos flavonóides inclui os flavonóis miricetina, quercetina, campferol e isoramnetina, os quais existem na forma de glicósidos conjugados e agliconas; os flavanóis catequina e epicatequina; e as antocianinas como a malvidina, a cianidina e a apigenina. Os não-flavonóides englobam o ácido gálico; hidroxicinamatos, incluindo o ácido *p*-cumárico, o ácido caféico e o ácido caftárico; e os estilbenos, *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-O- $\beta$ -glicósido (Burns et al., 2001).

No vinho ainda existem os taninos, que são polímeros fenólicos responsáveis pela adstringência. Esses são classificados em dois grupos: os taninos hidrolisáveis, derivados dos não-flavonóides, e taninos condensados, derivados dos flavonóides (Santos & Mello, 2000).

Os compostos fenólicos são constituintes das uvas e por isso estão presentes tanto no vinho tinto como no branco (Kanner et al., 1994; Jang et al., 1997). Contudo, a quantidade no vinho tinto é maior (1000 – 4000mg/ L) do que no branco (200 – 300mg / L) (Bravo, 1998). Estes compostos desempenham função importante na qualidade do vinho, contribuindo para seu sabor e aroma (Mamede, Cardello & Pastore, 2005).

Pode-se perceber então, a complexidade do vinho em sua composição. Além dos constituintes já citados, o vinho possui muitas outras substâncias como: aldeídos, ésteres, glicerina, minerais e compostos nitrogenados. Esses constituintes são úteis para diferenciar os vários tipos de vinhos, indicam sanidade e qualidade dos mesmos e determinam a quantidade de compostos desejáveis e não-desejáveis à dieta (Amerine & Joslyn, 1970).

## **2.2. Suco de uva**

Segundo Dani et al. (2007), as uvas são ricas em compostos fenólicos, como os flavonóides (catequina, epicatequina, quercetina, antocianinas e procianidinas) e o resveratrol (3,5,4-trihidroxi-estilbeno), os quais são encontrados, principalmente, em produtos de uva tinta. Como o suco de uva é fonte relevante de compostos fenólicos, muitas pessoas estão percebendo a importância de seu consumo na sua dieta diária (IFOAM, 2005 apud Dani et al., 2007). Além dos compostos fenólicos, a vitamina C também é encontrada nos sucos de uva. Em vegetais, a vitamina C fornece proteção contra espécies reativas geradas nos processos de respiração e fotossíntese (Barata Soares et al., 2004). Os conteúdos de fenólicos totais e de antocianinas nas uvas variam de acordo com a espécie, variedade, maturação, condições climáticas e cultivar (Mazza, 1995; Shahidi & Naczk, 1995).

O consumo de suco de uva como fonte de compostos fenólicos pode apresentar vantagem com relação ao do vinho, já que a ausência de álcool permite que seja consumido pela maioria das pessoas, inclusive aquelas portadoras de algumas doenças (por exemplo, a hepatite) e crianças (Romero-Pérez et al., 1999). Além disso, os autores Pereira & Daudt (1995), Glória et al. (1998) relatam que o vinho pode conter substâncias, tais como uréia, metanol e aminas biogênicas, que quando consumidas indiscriminadamente causam efeitos tóxicos no organismo humano.

Têm sido relatados alguns benefícios do consumo de suco de uva à saúde, como a melhora no funcionamento do endotélio, o aumento da

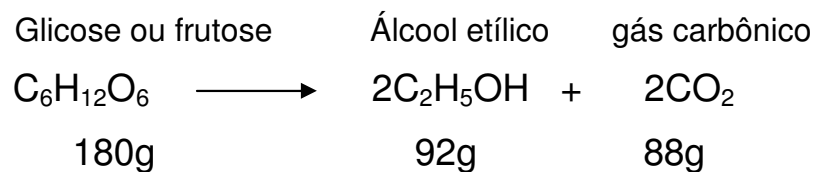


capacidade antioxidante sérica, a proteção das LDLs contra a oxidação e redução da agregação plaquetária (Dávalos et al., 2005).

Segundo Shanmuganayagam et al. (2007), o suco de uva Concord atenuou a agregação plaquetária, o colesterol sérico e o desenvolvimento de ateroma em coelhos hipercolesterolêmicos. Também, os compostos fenólicos do suco de uva Concord podem ser benéficos em reverter o curso neuronal e comportamental do envelhecimento, possivelmente através de uma multiplicidade de efeitos diretos e indiretos que podem afetar uma variedade de parâmetros neurológicos (Shukitt-Hale et al., 2006).

### 2.3. Etanol

O processo de fermentação alcoólica é mais complexo do que o indicado pela equação de Gay-Lussac, exposta abaixo:



A fermentação alcoólica ocorre em uma série de fases bem definidas envolvendo a formação de inúmeros intermediários importantes e a interação de vários sistemas enzimáticos. Porém, o produto principal da fermentação alcoólica é o etanol, formado pela transformação dos açúcares glicose e/ou frutose. A quantidade de álcool produzido varia de acordo com a espécie de levedura utilizada e depende da composição, da temperatura e da aeração do meio (Amerine & Joslyn, 1970).

De acordo com Serafini, Maiani & Ferro-Luzzi (1997), o etanol pode reduzir interações químicas entre proteínas (prolina e hidroxiprolina salivares) e taninos do vinho tinto, diminuindo a sensação de adstringência. Estes autores também sugerem que o álcool parece contribuir indiretamente com a capacidade antioxidante do vinho aumentando a biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

Na maioria dos países, o risco de mortalidade por distúrbio coronariano está relacionado com a alta ingestão de gordura saturada e os altos níveis séricos de colesterol (Fleming, Mihic & Harris, 2001). A França é exceção a esta regra, com mortalidade por doença coronariana relativamente baixa, apesar do consumo de grandes quantidades de gorduras saturadas (“o paradoxo francês”). Estudos epidemiológicos sugerem que o alto consumo de vinho é um dos fatores que confere o efeito cardioprotetor em comparação com os abstêmios. Conforme Maclure (1993), dados baseados em vários estudos revelam, sistematicamente, índices mais baixos de angina de peito, infarto do miocárdio e doenças das artérias periféricas entre aqueles que consomem quantidades leves (1-20g/dia) a moderadas (21-40g/dia) de álcool.

## **2.4. Lipídios**

Os esteróis são lipídios estruturais e estão presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas. Sua estrutura característica é um núcleo esteróide constituído de quatro anéis fundidos. O colesterol é o mais importante esterol dos tecidos animais. Além de seus papéis como constituintes de membranas, os esteróis servem como precursores de vários produtos com atividades biológicas específicas, como por exemplo, hormônios esteroidais e ácidos biliares (Nelson & Cox, 2002).

O interesse no estudo dos lipídios surgiu no século XIX, em 1847, com Vogel, primeiro investigador a detectar a presença de colesterol nas placas de ateroma. No início do século XX, na Alemanha, estudos experimentais realizados com ratos conseguiram demonstrar que estes, quando alimentados com dieta rica em colesterol, desenvolviam hipercolesterolemia e lesões ateromatosas (Bertolami & Bertolami, 1986; Lima et al., 2000). No homem, a causa mais comum de hipercolesterolemia é decorrente de erro alimentar, isto é, da adoção de dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas (Ribeiro & Shintaku, 2004).

A insolubilidade dos lípidios em água aumenta a complexidade de seu metabolismo, criando a necessidade de um sistema carregador: as

lipoproteínas (Ribeiro & Shintaku, 2004). Existem seis classes de lipoproteínas que diferem em tamanho e densidade na composição química e no elenco de apolipoproteínas presentes nas partículas, a saber: quilomícrons e seus remanescentes, que transportam os lípidios provenientes da dieta aos tecidos periféricos e fígado; lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL); lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de densidade baixa (LDL), que transportam lípidios de síntese endógena, do fígado aos tecidos periféricos, e a lipoproteína de densidade alta (HDL) que, acredita-se, seja a responsável pelo transporte reverso de colesterol, dos tecidos periféricos ao fígado (Pasqualucci et al., 1999; Douglas, 2002; Brandão et al., 2005). Este órgão tem papel central na regulação da síntese, degradação e armazenamento de lípidios e lipoproteínas.

Há cerca de 40 anos começou a ser dada maior ênfase ao papel da dieta na saúde e enfermidades crônico-degenerativas, como as doenças cardiovasculares, dislipidemias, diabetes mellitus (DM) não insulino-dependente, diferentes tipos de câncer e obesidade, sendo considerável o interesse pelos lípidios dos alimentos (Lima et al., 2000). A redução do colesterol dietético diminui o circulante, bem como os níveis de LDL; por isso, a dieta, dependendo da sua composição, pode representar fator de risco dessas doenças, ou ter uma função protetora sobre elas (Souza & Garcia, 1996).

#### 2.4.1 Gema de Ovo

Os ovos são alimentos de alto valor nutricional, já que possuem todas as vitaminas, aminoácidos e minerais essenciais. Sua proteína, a albumina, é dotada de alto valor biológico e foi considerada durante muito tempo como proteína padrão pela Organização para Alimentos e Agricultura da Organização Mundial da Saúde (FAO-OMS) (Guassi et al, 2008). Atualmente, a OMS estabelece como proteína padrão uma proteína teórica, porém, a albumina é ainda aquela que mais se aproxima desta em composição nutricional (Vieira, 2000). Os ovos constituem-se ainda como alimentos

baratos e acessíveis a populações de todos os níveis sociais (Salvador & Dalla Santa, 2002).

Contudo, um ovo, ou mais precisamente, sua gema, contém 213 mg de colesterol. Substância complexa semelhante à gordura (lipídio composto por álcoois esterólicas), o colesterol é sintetizado nas quantidades necessárias pelo organismo e se encontra em todos os tecidos animais, mas especialmente concentrado no fígado, nos rins, nas glândulas supra-renais e no cérebro. Trata-se de um composto vital para o organismo, essencial nas membranas das células, na produção dos hormônios sexuais, da vitamina D e de sucos digestivos. Nos tecidos nervosos, desempenha papel isolante, e dele se originam também os sais biliares (Brandão et al., 2005). Porém, em altas concentrações o colesterol está relacionado à indução de doenças coronárias e aterosclerose (Salvador & Dalla Santa, 2002). Assim a gema de ovo pode ser uma fonte eficaz de colesterol e uma proposta de modelo experimental de hipercolesterolemia de baixo custo.

O colesterol é encontrado somente em alimentos de origem animal, portanto, para a diminuição da ingestão, deve-se restringir o consumo de leite integral e seus derivados (queijo amarelo, manteiga, creme de leite), sorvetes cremosos, carne vermelha gordurosa, carne de porco, bacon, embutidos em geral, vísceras e alguns animais marinhos (camarão, lagosta e ostra). Atenção especial ao consumo da gema do ovo, lembrando que participa também do processo de diversos alimentos como bolos, tortas, panquecas e massas em geral (Waitzberg & Borger, 2002). Assim, o consumo reduzido de colesterol aumenta a sobrevivência global e diminui o risco de eventos relacionados à aterosclerose em pacientes com cardiopatia coronariana estabelecida (Kannel & Wilson, 1995).

## **2.5 Estresse oxidativo X Hipercolesterolemia**

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, em prol dos oxidantes, prejudicando a integridade celular (Sies, 2000). As células estão continuamente produzindo radicais

livres e espécies reativas de oxigênio (radicais livres e derivados não radicalares do oxigênio) como parte do processo metabólico. Esses radicais livres possuem grande reatividade e instabilidade e, por isso, podem atacar componentes celulares provocando danos em lipídios, proteínas e no DNA, o que desencadeia uma série de eventos envolvidos em diversas doenças. As espécies reativas são normalmente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes presentes nos organismos. Assim, o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) quanto da redução da capacidade antioxidante celular total (Halliwell, 1992; Dawson & Dawson, 1996).

A hipercolesterolemia é o maior fator de risco para doenças cardiovasculares. Há aumento nas evidências que suportam que um dos mecanismos que pode ser ativado na hipercolesterolemia, podendo também retardar doenças coronárias é a mudança na atividade seqüestradora de radicais e do estado redox (Saini et al., 2004; Montilla et al., 2006). Espécies reativas de oxigênio (EROs) produzem injúria tecidual por iniciação de modificações oxidativas em lipídios, proteínas e DNA, o que pode estar envolvido em vasculopatias induzidas por hipercolesterolemia (Kálman et al., 2001).

Recentes estudos têm demonstrado que a utilização alterada do oxigênio e/ou a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) contribuem para a progressão da aterogênese e das doenças cardiovasculares. Diversas fontes de EROs e ERNs estão presentes na aterosclerose. A geração exagerada destas espécies reativas ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante causando a ativação de neutrófilos, peroxidação lipídica, modificação protéica e quebra do DNA (Kaliora et al., 2006)

Os antioxidantes são substâncias que direta ou indiretamente protegem os sistemas celulares dos efeitos tóxicos produzidos por radicais oxidativos (Halliwell, 1995). Existem diversos compostos com ação biológica e importante função antioxidante, entre eles: vitamina C, glutathione, glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase e catalase (Krishna et al., 1996; Halliwell, 1999). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel, citosólico, que remove radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio

singlete ( $^1O_2$ ). Também, a glutathiona age como coenzima de várias enzimas e protege contra os radicais livres de oxigênio e compostos tóxicos. A porção tiólica é chave nas propriedades antioxidantes da molécula, que é usada como substrato para que a enzima GPx realize a redução de peróxidos.

As membranas celulares, que contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, podem sofrer danos mediados por radicais livres. A lipoperoxidação é causada por radicais que reagem com lipídios formando hidro ou lipoperóxidos que são altamente reativos e podem seguir uma cascata oxidativa que libera produtos como o malondialdeído (MDA). A quantificação de tal composto por reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) tem sido usada para avaliar o dano oxidativo (Ohkawa et al., 1979).

Considerando que a hipercolesterolemia pode induzir danos que seriam responsáveis pela incidência de aterosclerose e doenças cardiovasculares, antioxidantes dietéticos têm atraído considerável atenção como agentes preventivos e terapêuticos. Inúmeras evidências obtidas por estudos *in vitro*, *in vivo*, intervenções controladas e estudos em modelos animais demonstram que o consumo de antioxidantes previne a progressão desses danos (Otero et al., 2002; Bleys et al., 2006; Frederiksen et al., 2007)

## 2.6 Compostos fenólicos e seus efeitos antioxidantes

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio (Mamede & Pastore, 2004). Estes compostos presentes na dieta têm propriedades antioxidantes porque podem capturar radicais livres e então minimizar o dano oxidativo (Villaño et al., 2005).

Rice-Evans, Miller & Paganga (1997) demonstraram que a atividade antioxidante dos flavonóides *in vitro* foi maior que da vitamina C e E. Os compostos fenólicos do vinho tinto também exerceram potente atividade antioxidante em inibir a oxidação da LDL humana *in vitro* (Frankel et al., 1993; Kanner et al., 1994). Existem diversos estudos evidentes na literatura indicando que os polifenóis são agentes redutores e seqüestradores de

radicais livres, podendo participar na regeneração de outros antioxidantes, como a vitamina E (Rice-Evans et al., 1996 apud Wagner et al, 2006).

Segundo Formica & Regelson (1995), os flavonóides possuem a capacidade de inibir enzimas como as ciclooxigenases e quinases envolvidas no processo de proliferação celular e apoptose. Também, o consumo elevado de compostos fenólicos já demonstrou diminuir as concentrações séricas de colesterol e triglicérides em ratos (Kama-Eldin et al., 2000).

Considerando o exposto acima, o presente estudo foi conduzido a fim de estudar os efeitos combinados de compostos fenólicos e etanol em vinho tinto, comparando-os com os possíveis benefícios proporcionados por suco de uva e etanol, isoladamente, como resposta ao consumo de dieta hiperlipídica rica em colesterol sobre ratos adultos.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito apresenta-se em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à revista Food Chemistry.



### **3.1 Effects of red wine, grape juice and ethanol in adult rats fed with hyperlipidemic diet.**

Guilherme Barcellos de Moura, Andressa Sausen de Freitas, Anne Y Castro  
Marques, Tiffany Prokopp Hautrive, Aline Augusti Boligon, Silvane Roman, Leila  
Picolli da Silva, Neidi Garcia Penna.

Manuscrito a ser submetido para publicação

**Effects of red wine, grape juice and ethanol in adult rats fed with  
hyperlipidemic diet**

Guilherme Barcellos de Moura<sup>1</sup>, Andressa Sausen de Freitas<sup>2</sup>, Anne Y Castro Marques<sup>1</sup>, Tiffany Prokopp Hautrive<sup>1</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>3</sup>, Silvane Roman<sup>2</sup>, Leila Picolli da Silva<sup>4</sup>, Neidi Garcia Penna<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

\*Correspondence should be sent to:

Guilherme Barcellos de Moura

Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

Phone: 55-55-32208254

FAX: 55-55-32208353

E-mail: [guidemoura@yahoo.com.br](mailto:guidemoura@yahoo.com.br)

## Abstract

Special attention has been focused on protection against diseases associated with oxidative stress such as cancers, diabetes, cardiovascular diseases, aging and neurodegenerative disease. Previous reports indicate that high-cholesterol diets induced oxidative stress and hypercholesterolemia in rats. Some dietary compounds such as polyphenols found in red wine and grape juice have demonstrated to be potent antioxidants, behaving as ROS scavengers, metal chelators and enzyme modulators. Therefore, this study was conducted to evaluate the effects of red wine, grape juice and ethanol in adult Wistar rats fed with an egg yolk enriched diet. Animals were treated daily with hypercaloric diets containing 0% and 0,627% cholesterol and submitted to red wine, grape juice and ethanol moderated doses for 35 days. Experimentally, red wine, grape juice and ethanol partially prevented lipid peroxidation and restored non-proteic thiols content of high cholesterol treated animals. Liver histology assessment indicated that only grape juice, of all beverages, reduced hepatic cell damage and improved histomorphology of the liver similar to cholesterol untreated rats. Conclusively, we can suggest that grape juice is excellent alternative to red wine in this model of high cholesterol diet.

*Keywords:* oxidative stress, Wistar rats, polyphenols, cholesterol.

## 1. Introduction

Considerable experimental evidence has contributed to support a key role of reactive oxygen species (ROS) in the numerous mechanisms. While enzymatic and non-enzymatic systems preserve the antioxidant/oxidant status, these defense systems become overwhelmed during oxidative stress, a metabolic derangement due to an imbalance caused by excessive generation of ROS or a diminished antioxidant capacity (Rodrigo & Bosco, 2006).

According to Tedesco et al. (2000), ROS are generated in biological systems through metabolic processes and exogenous sources such as drugs, ultraviolet light, ionizing radiation, pollution and food components. Previous reports indicate that high-cholesterol diets induced oxidative stress and hypercholesterolemia. It is also known that high-cholesterol diet induces ROS overproduction which could in turn initiate lipid peroxidation (Montilla, Espejo, Muñoz, Bujalance, Muñoz-Castañeda & Tunez, 2006).

Many defense mechanisms have developed in living organisms to limit the levels of ROS and the damage they inflict. Included among them are endogenous enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. In addition to these endogenous mechanisms, much attention has been paid to the antioxidant role of some dietary compounds such as polyphenols, a class of molecules found in abundance in vegetables and red wine (Tedesco et al., 2000).

Red wine contains a variety of polyphenols derived from the skin of the grape and these include flavonols (quercetin and myricetin), flavanols (catechin and epi(gallo)catechin), gallic acid, condensed tannins (catechin and epicatechin polymers), and polymeric anthocyanins (Howard, Chopra, Thurnham, Strain, Fuhrman, & Aviram, 2002). The polyphenolic compounds of wine could be implicated in enhancing the antioxidant system, since they behave as ROS scavengers, metal chelators and enzyme modulators. In agreement with this view, it was demonstrated that wine protects the kidney against the deleterious effect of low-density lipoprotein (LDL) on the glomerulus. (Rodrigo, Rivera, Orellana, Araya & Bosco, 2002).

As has been seen with respect to red wine, Concord grape juice is a rich source of flavonoids that include catechins, epicatechins, quercetins, anthocyanins, and proanthocyanidins and are potent antioxidants (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley & Pridham, 1995; O'Byrne, Devaraj, Grundy & Jialal, 2002). In humans, Concord grape juice has been shown to inhibit platelet activity and protect against epinephrine activation of platelets, perhaps by enhancing platelet and endothelial

production of nitric oxide. Consumption of Concord grape juice by patients also offered increased protection against low-density lipoprotein cholesterol oxidation, even though many patients were also taking another antioxidant, vitamin E (Shukitt-Hale, Carey, Simon, Mark & Joseph, 2006).

Additionally, the alcohol mainly present in beverages, when consumed moderately was associated with reduced mortality rates, reduced risk for angina pectoris, myocardial infarction, and stroke (Bantle, Thomas & Bantle, 2008). The inverse association between alcohol consumption and cardiovascular disease was strongest in men with high plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels (Hein, Suadicani & Gyntelberg, 1996).

The aim of the present study was to evaluate the effects of phenolic compounds in red wine, comparing with the effects of grape juice polyphenols and an ethanol solution in adult rats fed with hyperlipidemic diet.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Samples**

Red wine and grape juice samples was donated by a producer, obtained from the 2007 vintage and elaborated from Isabel grapes. Ethanol solution with the same alcoholic graduation of red wine (9.67%) was prepared at the Department of Food Science and Technology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brazil.

### **2.2. *In vitro* Assays**

#### **2.2.1. Total Phenolic Content**

To determine total phenolic content of wine and grape juice was used the method of Chandra and De Meija (2004), with Folin-Ciocalteu 2N as reagent.

### 2.2.2. Determination of Antioxidant Activity

Antioxidant Activity of wine and grape juice was evaluated by the photocolometric method of DPPH inhibition according to Choi et al. (2002).

### 2.3. Hyperlipidemic Diets

Diets were prepared by the method of Reeves, Nielsen and Fahey Jr. (1993), with some modifications. The lipid levels of AIN-93M diet were increased from 4% to 15% of total diet, replacing carbohydrates (corn starch and sucrose), which resulted on hypercaloric diets. Two formulations were made having different source of lipids. In the first formulation (VFD) it was used only soybean oil, a vegetal fat source (0% cholesterol), as in the original AIN-93M diet. The second formulation (AFD) used dehydrated egg yolk (powder), an animal fat source to enhance the cholesterol levels from 0 to 0.627% of total diet (Table 1).

### 2.4. Animals and Treatments

Forty adult Wistar rats (male), 50 days old and weighting approximately 115 - 205g were housed in individual metabolic cages, maintained at  $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , on a 12:12h light/dark cycle, with free access to food and tap water.

Animals were divided in five experimental groups: VFD and tap water (VFD); AFD and tap water (AFD-W); AFD and ethanol solution (AFD-E); AFD and grape juice (AFD-GJ) and AFD and red wine (AFD-RW). Rats were treated daily for 35 days and received ethanol solution, grape juice and red wine by oral gavage. The administered doses were based on moderate human consumption (200mL/70kg/day) of red wine according to Vinson, Teufel and Wu (2001). Water groups received the oral gavage treatment as well as the other groups to eliminate stress effects during animal handling.

## 2.5. Tissue preparation and plasma analysis

After the treatment period (35 days) and an overnight fast the animals were weighed, anesthetized and a cardiac puncture was performed. Plasma was isolated from blood and collected. Total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, total protein, uric acid and glucose were measured with commercial enzyme kits (Doles, Goiânia, GO). Livers were quickly removed, weighed and cut. A piece of liver tissue was placed on ice and homogenized in 10 volumes of Tris-HCl 10mM, pH 7.4. Remaining liver tissue was placed on a 10% formaldehyde solution for histological assessment. Kidney and epididimal fat were removed, weighed and discarded.

## 2.6. Lipid Peroxidation

TBARS (thiobarbituric acid reactive species) were determined in liver homogenates by the method of Ohkawa, Ohishi and Yagi (1979) with minor modifications (Puntel, Roos, Grotto, Garcia, Nogueira & Rocha, 2007), in which malondialdehyde (MDA), an end product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex.

## 2.7. Determination of non-enzymatic antioxidant defenses

Glutathione (GSH) was measured as nonproteic thiols (NPSH). To determine NPSH, 500 $\mu$ L of trichloroacetic acid was added to 500  $\mu$ L of liver homogenates. After centrifugation (4000 x g at 4°C for 10 min), the protein pellet was discarded and free sulfhydryl groups (-SH) were determined in the clear supernatant (Ellman, 1959). Ascorbic acid (Vitamin C) determination was performed as described by Jacques-Silva, Nogueira, Broch, Flores and Rocha (2001).

## 2.8. Histological Assessment

Liver histology was used to complete the study on liver. Hepatic tissue fixed in 10% formaldehyde solution was routinely processed and embedded in paraffin. Sections of 5–6  $\mu\text{m}$  thick were cut and stained with hematoxylin and eosine (H and E). Then it was analyzed and photographed with a microscope coupled to a computer software.

## 2.9. Statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA. Differences between the groups were compared by Duncan's multiple range test,  $P < 0.05$ . Statistical analyses were performed with SPSS 8.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 3. Results

The red wine and grape juice were characterized by total phenolic contents. The estimation of total polyphenolic content by Folin–Ciocalteu method showed that grape juice and red wine contained a concentration of 0.62 and 0.73 mg Eq gallic acid/mL, respectively. Also Antioxidant Activity was measured by capacity to inhibit DPPH radical, red wine and grape juice demonstrated 93.06% and 82.4% DPPH inhibition (data not shown).

The results *in vivo* showed food consumption and body weight gain were significantly higher in rats that received cholesterol diet and water (AFD-W) when compared to the other groups. Rats of VFD group presented significantly lower liver weights than the other groups but had higher kidney weights than rats with cholesterol diet and red wine (AFD-RW). Epididimal fat weight was significantly lower in rats of red wine group when compared to VFD, AFD and AFD-E groups. Grape juice group (AFD-GJ) presented similar epididimal fat weight to red wine group (Table 2).

Animals of diet 2 that received ethanol (AFD-E) showed an increase on cholesterol levels when compared to other groups. HDL levels were the highest in rats that received diet without cholesterol. There were no significant differences on HDL levels of groups that received cholesterol. Rats of red wine group



maintained similar LDL levels to rats of VFD group while the other treatments showed a significant increase on LDL levels when compared to VFD group. Triglycerides levels were statistically higher on animals that belong to AFD-E and AFD-RW groups when compared to the other groups. Animals that received cholesterol diet and water demonstrated the lowest protein levels, where the significant statistical differences occurred only when compared these group to ethanol and grape juice groups. Glucose and uric acid levels had no statistical differences between the groups (Table 3).

Cholesterol treatment (AFD-W group) greatly increased TBARS levels when compared to VFD group. Ethanol, grape juice and red wine partially prevented the cholesterol-induced increase in TBARS levels (Fig. 1A). Treatment with cholesterol (AFD-W group) caused a significant decrease in hepatic NPSH content. Ethanol, grape juice and red wine restored hepatic NPSH to control levels (Fig. 1B). The lowest ascorbic acid levels were in grape juice and red wine groups (Fig. 1C).

Histological analysis pointed that animals of VFD group presented a normal hepatic tissue. Grape juice group showed similar cell structure to VFD group while other groups demonstrated some alterations highlighting cytoplasmatic vacuolization (that could represent lipid accumulation) and nuclear hyperchromatism (signal of inactive cell) (Figure 2).

#### **4. Discussion**

In this work, it was created an experimental model for wine, grape juice and ethanol moderated consumption in Wistar rats. Results of food consumption showed that rats accepted better AFD diet (containing egg yolk) than VFD diet, what could explain the highest body weight values of AFD-W group. Moderate red wine, grape juice and ethanol consumption avoided this large food consumption (as in AFD-W group) probably by causing a premature satiety. Consequently, these beverages prevented the increase in body weight of rats. Some actions of polyphenolics present in red wine and grape juice on body weight control have been reported in both humans and laboratory animal models. In humans, catechin increases the metabolic rate and fat oxidation levels, and in obese rodents it reduces body weight (Bargalló et al., 2006). According to Kachani, Brasiliano and

Hochgraf (2008), responses to alcohol consumption are different from one human to another and determined by individual factors and possible unknown genetic factors. As alcohol theratogenicity, body weight gain related to ethanol consumption has different responses according to some individual factors. Here it was observed that moderate alcohol consumption avoided enhanced body weight gain in rats.

However, ethanol (AFD-E) increased cholesterol levels compared with other groups. Alcohol is toxic to human organism and must be eliminated immediately. It has priority on metabolism altering other metabolic routes including lipid oxidation, what could lead to fat accumulation (Kachani et al., 2008). Therefore, we suggest that these enhanced cholesterol levels might be related to metabolic alterations caused by alcohol consumption. Despite ethanol is present in red wine, the AFD-RW group presented a slight hypocholesterolemic effect probably due to the daily doses of polyphenols (Vinson et al., 2001)

In our study red wine was better than ethanol or grape juice in lowering LDL levels, but consequently showed the highest triglycerides levels. Recently, Mosca, Rubenfire, Tarshis, Tsai and Pearson (1997) found that regular wine consumers had lower levels of oxidized LDL in their plasma than nondrinkers. Pure polyphenols have been found to bind to LDL+VLDL and protect it from ex vivo oxidation after plasma spiking and affinity column isolation (Vinson, Jang, Dabbagh, Serry & Cai, 1995). Most recently red wine polyphenols have been shown to exhibit this binding (Vinson, Jang, Yang, Dabbagh, Liang & Serry, 1999).

According to Stinshoff, Weisshaar, Staehler, Hesse, Gruber, and Steler (1977), quantitative analysis for triglycerides in serum and plasma is commonly done by hydrolyzing the triglycerides and then determining glycerol enzymatically or chemically. When this is done, however, not only glycerol derived from the triglycerides but also the unesterified "free" glycerol is measured. Also, glycerol content in wines is 6-10g/100g of alcohol, with average of 8,4g (Toledo, 1963). These observations could explain the highest values of triglycerides in rats that received red wine. Additionally, results of epididimal fat weight showed rats that received red wine presented the lowest fat deposition (probably a higher amount of circulating lipids) when compared to rats of ethanol and grape juice groups.

The levels of uric acid and glucose are not contributory factors, since it showed no differences between the groups.

There was a clear decrease in lipid peroxidation and a significant antioxidant capacity restoration in the animals that drank red wine, grape juice and ethanol when compared to AFD-W group, as is shown by the significantly lower levels of MDA and higher NPSH levels in the liver. These effects can be ascribed in part to the direct antioxidant properties of the polyphenolic flavonoids (lipidic peroxy radical scavengers and metal-ion chelators) (Vinson et al., 2001). Interestingly, ethanol, normally considered as an *in vivo* pro-oxidant, was an antioxidant in this model, as shown by its effect on liver lipid peroxides.

Unlike other experiments (Pari & Suresh, 2008) that showed a restoring effect on vitamin C levels, here we noted that the lowest vitamin C levels were in rats that received red wine and grape juice. We suggest that these levels represented polyphenols protection, absent on VFD, AFD-W and AFD-E groups. Therefore, these other groups required higher vitamin C antioxidant defenses. Still, these values did not interfere in its capacity to diminish lipid peroxidation.

Administration of grape juice to cholesterol treated rats reduced the liver cell damage and improved the histomorphology of the liver near to normal. The results of histological observations suggest that great cholesterol intake leads to serious changes in histology of rat liver, including lipid accumulation. The membrane protective properties and antioxidant nature of grape juice polyphenols might be helpful to alleviate the pathological changes caused by cholesterol in liver. Improvement effects observed in rats of grape juice group were not evidenced in red wine group probably due to the presence of alcohol which, according to Ajmo, Liang, Rogers, Pennock and You (2008), is capable to inhibit critical signaling molecules regulating the pathways of hepatic lipid metabolism in animals.

In conclusion, the results of the present investigation support a scavenger and antioxidant role of red wine and grape juice. Specially grape juice is excellent alternative to red wine in this model of high cholesterol diet.

## **5. Acknowledgement**

The financial support by CAPES, Doles and Pantec are gratefully acknowledged.

## **6. Ethics Committee**

This work was approved by Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (nº 23081.002382/2008-14) and observed ethical standards set.

Table 1. Modified formulations of AIN-93M diet for maintenance of adult rodents.

Ingredient (g / Kg diet)	VFD	AFD
Cornstarch	560.692	560.692
Sucrose	50	50
Casein	140	37.706
Soybean oil	150	----
Egg yolk	----	268.8
Fiber (purified cellulose)	50	50
Mineral mix*	35	35
Vitamin mix*	10	10
L-Cystine	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone (BHT)	0.008	0.008
Chemical Composition (g/Kg)	VFD	AFD
Carbohydrates	610.692	610.692
Proteins	126	129.77
Lipids	150	150
Fibers	50	50
Cholesterol	0	0.627
Energy (Kcal)	4297	4312

\*Mineral and vitamin mixes composition (mg / Kg diet): Calcium 5000.0; Phosphorus 1992.0; Potassium 3600.0; Sulfur 300.0; Sodium 1019.0; Chloride 1571.0; Magnesium 507.0; Iron 35.0; Zinc 30.0; Manganese 10.0; Copper 6.0; Iodine 0.2; Molybdenum 0.15; Selenium 0.15; Silicon 5.0; Chromium 1.0; Fluoride 1.0; Nickel 0.5; Boron 0.5; Lithium 0.1; Vanadium 0.1; Nicotinic acid 30.0; Pantothenate 15.0; Pyridoxine 6.0; Thiamin 5.0; Riboflavin 6.0; Folic acid 2.0; Vitamin K 0.750; D-Biotin 0.200; Vitamin B-12 0.025; Vitamin A 4000 IU; Vitamin D3 1000 IU; Vitamin E 75 IU.

Table 2. Effect of different diets on food consumption, body weight gain and organs weights of rats.

	VFD group	AFD-W group	AFD-E group	AFD-GJ group	AFD-RW group
<b>Food Consumption (g/day)</b>	17.66 ± 0.54 <sup>a</sup>	19.32 ± 0.49 <sup>b</sup>	17.30 ± 0.59 <sup>a</sup>	17.45 ± 0.59 <sup>a</sup>	17.72 ± 0.54 <sup>a</sup>
<b>Body Weight Gain (g)</b>	126.78 ± 8.97 <sup>a</sup>	150.81 ± 7.80 <sup>b</sup>	123.86 ± 6.52 <sup>a</sup>	111.55 ± 5.91 <sup>a</sup>	128.44 ± 6.19 <sup>a</sup>
<b>Liver Weight (g%)</b>	2.99 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.71 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.53 ± 0.11 <sup>b</sup>	3.46 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.57 ± 0.08 <sup>b</sup>
<b>Kidney Weight (g%)</b>	0.65 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>a,b</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>a,b</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>a,b</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Epididimal Fat Weight (g%)</b>	1.76 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.77 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.06 <sup>a,b</sup>	1.44 ± 0.88 <sup>a</sup>

Values represent mean ± S.D. for food consumption, body weight gain and organs weights between 0 and 35 days of treatment (eight rats / group). (<sup>a,b</sup>) Values statistically different between groups (P<0.05) by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of different diets and liquids on cholesterol, triglycerides, LDL, HDL, glucose, uric acid and total protein plasmatic levels of rats.

Plasma Analysis	VFD group	AFD-W group	AFD-E group	AFD-GJ group	AFD-RW group
<b>Cholesterol (mg/dL)</b>	104.25 ± 2.54 <sup>a</sup>	103.74 ± 5.97 <sup>a</sup>	126.34 ± 9.52 <sup>b</sup>	114.20 ± 6.79 <sup>a,b</sup>	98.19 ± 4.00 <sup>a</sup>
<b>HDL (mg/dL)</b>	81.94 ± 6.58 <sup>b</sup>	56.03 ± 4.90 <sup>a</sup>	48.96 ± 2.03 <sup>a</sup>	51.55 ± 2.43 <sup>a</sup>	49.64 ± 2.15 <sup>a</sup>
<b>LDL (mg/dL)</b>	18.19 ± 5.38 <sup>a</sup>	43.23 ± 7.42 <sup>b,c</sup>	62.95 ± 9.61 <sup>c</sup>	50.27 ± 7.69 <sup>b,c</sup>	29.07 ± 4.04 <sup>a,b</sup>
<b>Triglycerides (mg/dL)</b>	53.54 ± 5.26 <sup>a</sup>	49.06 ± 9.62 <sup>a</sup>	84.02 ± 10.49 <sup>b</sup>	61.85 ± 4.74 <sup>a</sup>	118.06 ± 4.32 <sup>c</sup>
<b>Glucose (mg/dL)</b>	182.60 ± 2.66	204.58 ± 9.64	190.86 ± 17.61	190.90 ± 9.75	197.49 ± 3.23
<b>Uric Acid (mg/dL)</b>	2.96 ± 0.24	3.42 ± 0.43	3.07 ± 0.04	3.03 ± 0.30	2.89 ± 0.22
<b>Total Protein (mg/dL)</b>	6.63 ± 0.23 <sup>a,b</sup>	6.09 ± 0.17 <sup>a</sup>	6.90 ± 0.27 <sup>b</sup>	7.08 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.46 ± 0.32 <sup>a,b</sup>

Values represent mean ± S.D. for plasmatic levels between 0 and 35 days of treatment (eight rats / group). (<sup>a, b</sup>) Values statistically different between groups ( $P < 0.05$ ) by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test.

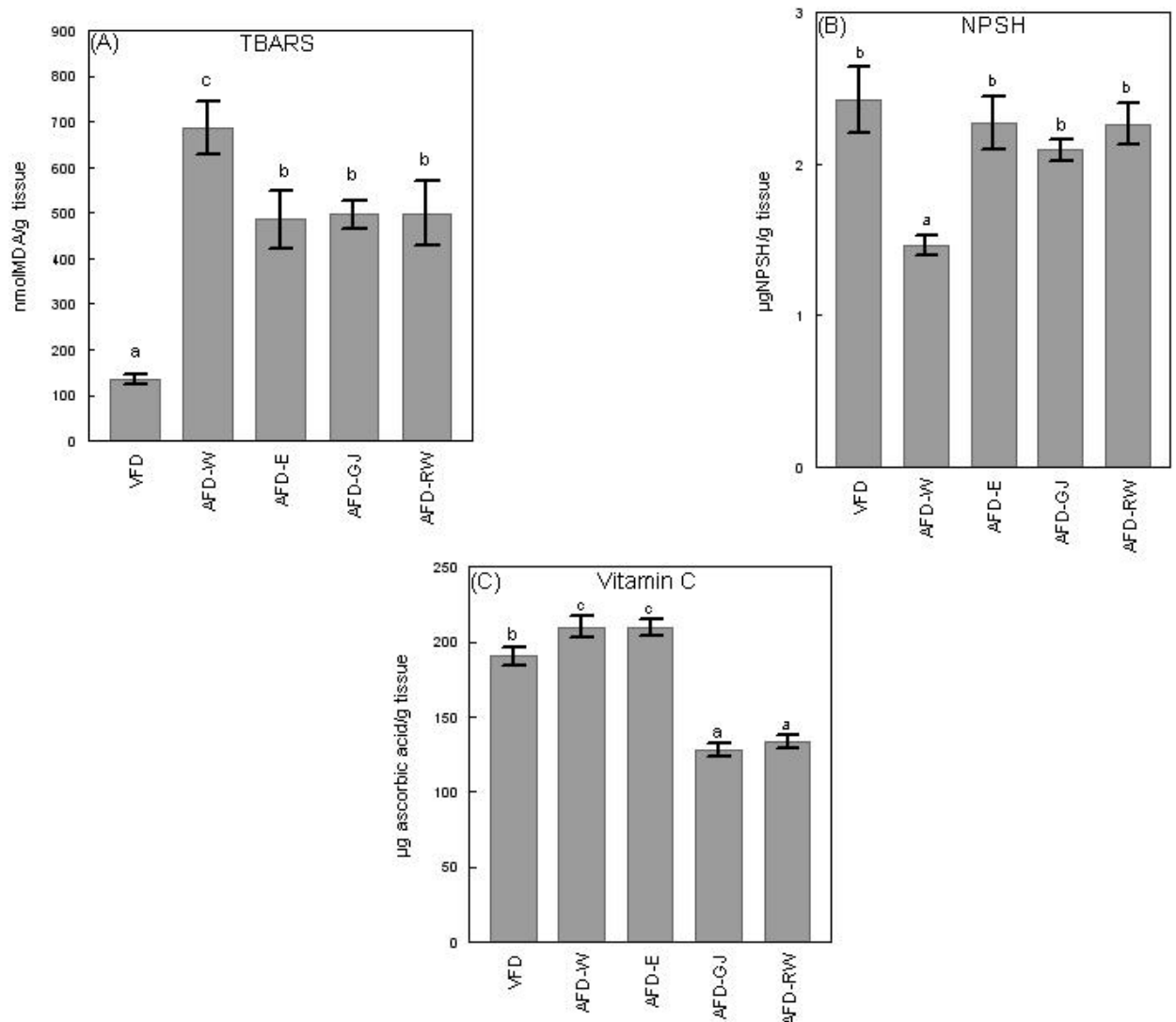


Fig. 1. Effects of ethanol, grape juice and red wine on TBARS (A), NPSH (B) and Vitamin C (C) levels in liver of rats treated for 35 days. Data are expressed as nmol MDA/g tissue (A), µg NPSH/g tissue (B), µg ascorbic acid/g tissue and represented as mean ± S.E. (<sup>a, b, c</sup>) Values statistically different compared to control ( $P < 0.05$ ) by one-way ANOVA, followed by the Duncan's multiple range test.

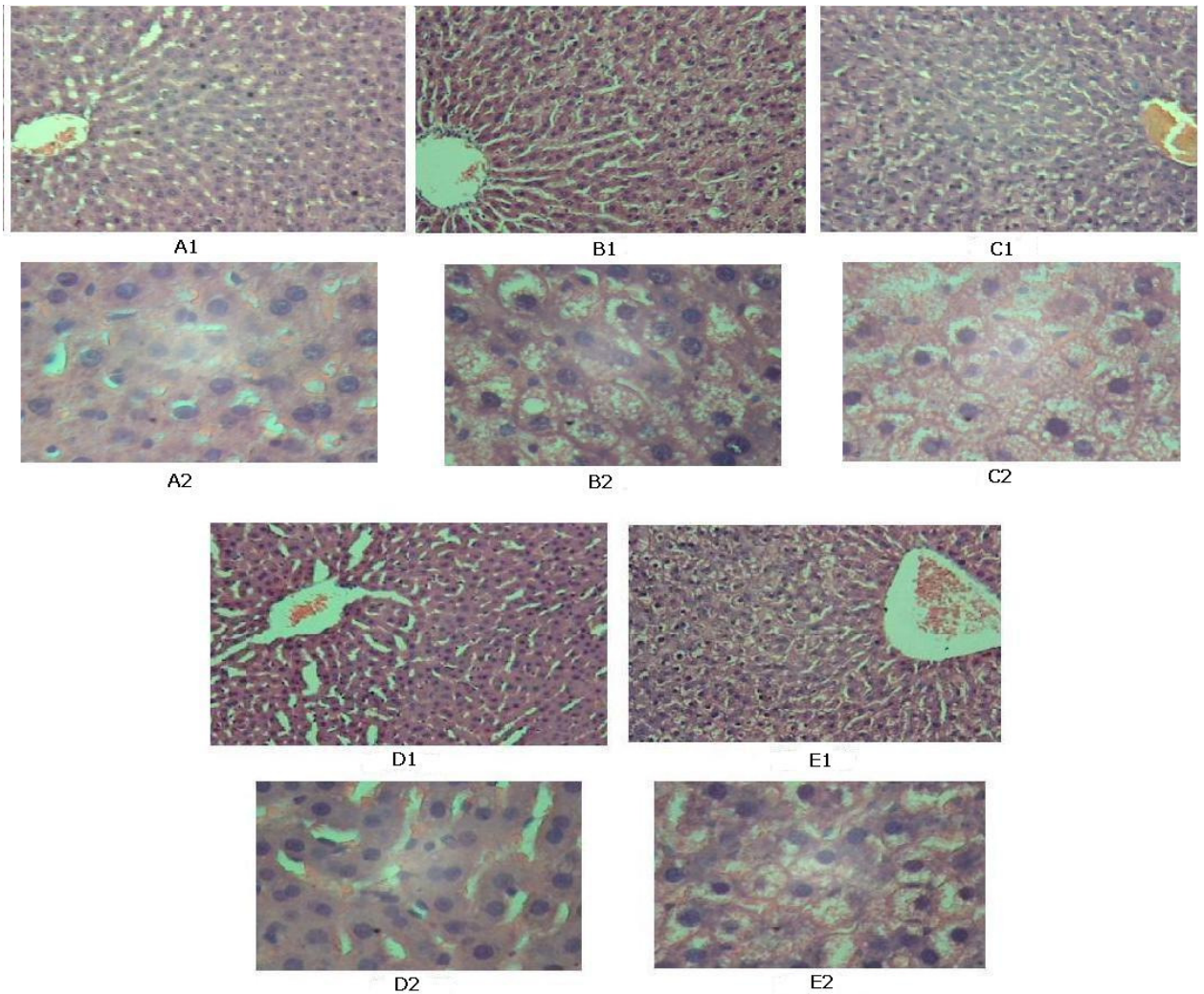


Fig. 2. Panel A1 and A2: Liver from a cholesterol-untreated rat. No abnormalities were observed. Panel B1 and B2: Liver from a cholesterol-treated rat. Panel C1 and C2: Liver from a cholesterol-treated rat that received ethanol. Panel D1 and D2: Liver from a cholesterol-treated rat that received grape juice. Panel E1 and E2: Liver from a cholesterol-treated rat that received red wine. Liver from rats H and E, stain, (A1,B1,C1,D1,E1 x 100) and (A2,B2,C2,D2,E2 x 400).

## 7. References

- Ajmo, J. M., Liang, X., Rogers, C.Q., Pennock, B., & You, M. (2008). Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295, 833-842.
- Bantle, A. E., Thomas, W., & Bantle, J. P. (2008). Metabolic effects of alcohol in the form of wine in persons with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57, 241-245.
- Bargalló, M. V., Grau, A. A., Fernández-Larrea, J. D., Anguiano G. P., Cegarra, M. C. B., Rovira, M. J. S., Ferré, L. A., & Olivé, M. B. (2006). Moderate red wine consumption partially prevents body weight gain in rats fed a hiperlipidic diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 139-142.
- Chandra, S., & De Mejia, E.G. (2004). Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583 – 3589.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., & Kim, S. K. (2002). Antioxidant Activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163(6), 1161-1168.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- Hein, H.O., Suadicani, P., & Gyntelberg, F. (1996). Alcohol consumption, serum low-density lipoprotein cholesterol concentration, and risk of ischemic heart disease: six-year follow-up in the Copenhagen male study. *BMJ*, 312, 736-741.
- Howard, A., Chopra, M., Thurnham, D. I., Strain, J. J., Fuhrman, B., & Aviram, M. (2002). Red wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components? *Medical Hypotheses*, 59(1), 101-104.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C. W., Broch, L. C., Flores, E. M., & Rocha, J. B. (2001). Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmaceutical Toxicology*, 88, 119-125.
- Kachani, A. T., Brasiliano, S., & Hochgraf, P. B. (2008). O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 35(1), 21-24.
- Montilla, P., Espejo, I., Muñoz, M. C., Bujalance, I., Muñoz-Castañeda, J. R., & Tunez, I. (2006). Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. *Clinical Nutrition*, 25, 146-153.
- Mosca, L., Rubenfire, M., Tarshis, T., Tsai, A., & Pearson, T. (1997). Clinical predictors of oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*, 90, 825-830.



O'Byrne, D. J., Devaraj, S., Grundy, S. M., Jialal, I. (2002). Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1367-1374.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351–358.

Pari, L., & Suresh, A. (2008). Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1627–1634.

Puntel, R. L., Roos, D. H., Grotto, D., Garcia, S. C.; Nogueira, C. W.; Rocha, J. B. (2007). Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: a comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. *Life Sciences*, 81(408), 51–62.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey Jr., G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 23(11), 1939-1951.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolics flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.

Rodrigo, R., & Bosco, C. (2006). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142(C), 317-327.

Rodrigo, R., Rivera, G., Orellana, M., Araya, J., & Bosco, C. (2002). Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sciences*, 71, 2881-2895.

Shukitt-Hale, B., Carey, A. B. S., Simon, L. B. A., Mark, D. A., & Joseph, J. A. (2006). Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition*, 22, 295-302.

Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., & Palumbo, R. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 114-119.

Vinson, J.A., Jang, J., Dabbagh, A., Serry, M. M., & Cai, S. (1995). Plant polyphenols exhibit lipoprotein- bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2798–2799.

Vinson, J. A, Jang, J., Yang, J., Dabbagh, Y., Liang, X., & Serry, M. (1999). Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 2502–2504.

Vinson, J. A., Teufel, K., & Wu, N. (2001). Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*, 156, 67-72.

## 4. DISCUSSÃO

Alguns trabalhos indicam que dietas ricas em colesterol induzem à hipercolesterolemia e ao estresse oxidativo em ratos. Além disso, essas dietas induzem a super produção de EROs, as quais, em parte, podem desencadear um processo de peroxidação lipídica (Montilla et al., 2006). Desta forma, acredita-se que agentes antioxidantes possam ser efetivos em reduzir os danos ocasionados pela hipercolesterolemia desenvolvida.

Os resultados do presente estudo demonstram que sinais evidentes dos efeitos de dieta rica em gordura animal foram os aumentos no consumo de comida e no ganho de peso corporal. Contudo, os tratamentos com vinho tinto, suco de uva e etanol demonstraram menor consumo de comida. Esses efeitos provavelmente tenham sido causados por aumento de saciedade pelas bebidas, resultando em menor ganho de peso dos animais. Além disso, têm sido reportadas algumas ações dos polifenóis presentes em vinho tinto e suco de uva no controle do ganho de peso em humanos e animais de laboratório. Em humanos, esse efeito é atribuído à catequina, que aumenta a taxa metabólica e os níveis de  $\beta$ -oxidação (Bargalló et al., 2006). Em animais de laboratório, a epigallocatequina é apontada como auxiliar na redução do peso corporal, como relatado por Kao et al. (2000). Tebib et al. (1996) demonstraram que uma dieta suplementada com taninos das sementes de uva induziram ratos de laboratório a ganhar menos peso do que o esperado.

A quantidade de álcool consumida, assim como a de alimentos ingeridos, repercute expressivamente no ganho de peso. É relevante também salientar que esse consumo alimentar pode ser adicionado ou substituído pelo álcool (Kachani et al., 2008). E, sobretudo, o valor energético dos alimentos adicionados ao consumo alcoólico e o patamar de consumo devem ser observados na relação de ganho de peso (Suter et al., 1997). Não se pode deixar de lembrar que as respostas ao consumo de álcool são diferentes de um indivíduo para o outro e são determinadas por fatores individuais e por possíveis fatores genéticos desconhecidos. Deve-se questionar não somente se as calorias do álcool devem ser contabilizadas, mas também de que maneira elas são aproveitadas pelo organismo. Da mesma forma que a teratogenicidade do álcool encontra diferentes respostas dependendo do

indivíduo, o ganho de peso relacionado ao consumo de etanol segue a mesma tendência.

O etanol aumentou (AFD-E) os níveis de colesterol total quando comparado aos outros grupos. O álcool é tóxico para o organismo humano e deve ser eliminado imediatamente, por isso possui prioridade no metabolismo causando alterações em rotas metabólicas que incluem a oxidação lipídica, a qual pode levar ao acúmulo de gordura (Kachani et al., 2008). Então, sugere-se que estes níveis aumentados de colesterol total podem estar relacionados com alterações metabólicas causadas pelo consumo de álcool. Apesar de o etanol estar presente no vinho tinto, o grupo AFD-RW apresentou leve efeito hipocolesterolêmico, provavelmente devido às doses diárias de polifenóis (Vinson et al., 2001).

De acordo com Fleming et al. (2001), na maioria dos países, o risco de mortalidade por distúrbio coronariano está relacionado com a alta ingestão de gordura saturada e os altos níveis séricos de colesterol. A França é uma exceção a essa regra, com mortalidade por doença coronariana relativamente baixa, apesar do consumo de grande quantidade de gordura saturada (o “paradoxo francês”). Estudos epidemiológicos sugerem que o amplo consumo de vinho pelos franceses é um dos fatores que conferem o efeito cardioprotetor. Os flavonóides encontrados no vinho tinto podem desempenhar papel extra na proteção da LDL contra o dano oxidativo. O LDL oxidado foi implicado em várias etapas da aterogênese (Hillbom et al., 1998).

Neste trabalho o vinho tinto demonstrou ser significativamente melhor do que o suco de uva e o etanol em diminuir os níveis de LDL, no entanto apresentou os maiores níveis de triglicerídeos. Mosca et al. (1997), descobriram que consumidores regulares de vinho mostraram menores níveis de LDL oxidada no plasma do que abstêmios. Polifenóis puros têm demonstrado ligar VLDL+LDL e proteger da oxidação *ex vivo* (Vinson et al., 1995). Mais recentemente, os polifenóis do vinho tinto têm exibido este poder de ligação (Vinson et al., 1999).

Segundo Stinshoff et al. (1977), as análises quantitativas para triglicerídeos em soro e plasma é feita comumente por hidrólise dos mesmos e determinação enzimática ou química de glicerol livre. No entanto, quando esta análise é realizada mede-se não somente o glicerol derivado de triglicerídeos, mas também o glicerol livre não-esterificado. Assim, é importante reforçar que o conteúdo de glicerol em vinhos é de 6 a 10g para cada 100g de álcool, com valores médios de 8,4g. (Toledo, 1963). Esta observação pode explicar os valores mais altos de triglicerídeos nos

ratos que receberam vinho tinto. Além disso, os resultados do peso de gordura epididimal demonstraram que os ratos que receberam vinho tinto apresentaram menor deposição de gordura (provavelmente maior quantidade de gordura na forma circulante) quando comparados àqueles dos grupos do etanol e do suco de uva.

Os danos ocasionados por dieta rica em colesterol são bem conhecidos e parecem estar relacionados ao aumento do estresse oxidativo. Neste estudo ocorreu clara diminuição da peroxidação lipídica e restauração significativa nos níveis de tióis não-protéicos nos animais que receberam vinho tinto, suco de uva e etanol, quando comparados aos animais do grupo AFD-W. Esses efeitos podem ser descritos, em parte, pelas propriedades antioxidantes dos flavonóides (seqüestradores de radicais peróxil lipídicos e quelantes de metais) (Vinson et al., 2001). Interessantemente, o etanol, considerado um pró-oxidante *in vivo*, atuou como antioxidante neste modelo, o que merece ser melhor investigado.

Ao contrário de outros experimentos (Pari & Suresh, 2008) que demonstraram efeito restaurador nos níveis de vitamina C, nesta pesquisa percebeu-se menores níveis de vitamina C para os ratos que receberam vinho tinto e suco de uva. Esses níveis representam o efeito protetor dos polifenóis, ausentes nos grupos VFD, AFD-W e AFD-E que, automaticamente, necessitaram maiores níveis de vitamina C para sua defesa antioxidante. Contudo, esses valores não interferiram na capacidade de esses animais em diminuir a peroxidação lipídica.

A administração de suco de uva aos animais tratados com colesterol reduziu os danos celulares e melhorou a histomorfologia do fígado próximo ao normal. Os resultados das observações histológicas sugerem que o grande consumo de colesterol leva à sérias mudanças na histologia de fígado de ratos, incluindo infiltração gordurosa. As propriedades protetoras de membrana e a natureza antioxidante dos polifenóis do suco de uva podem auxiliar na melhora das mudanças patológicas causadas pelo colesterol no fígado. Os efeitos observados nos ratos que ingeriram suco de uva não foram evidenciados no grupo AFD-RW provavelmente devido à presença do álcool que, de acordo com Ajmo et al., (2008) é capaz de inibir moléculas sinalizadoras críticas na trajetória da regulação do metabolismo lipídico dos animais. O etanol produz uma miríade de efeitos deletérios no fígado relacionados com a dose. Os principais efeitos são infiltração gordurosa do fígado, hepatite e cirrose (Fickert & Zatloukal, 2000). Segundo Lieber (1994), devido à sua toxicidade intrínseca, o álcool pode lesar o fígado sem a existência de deficiências

nutricionais. O acúmulo de gordura no fígado é um evento precoce e pode ocorrer nos indivíduos normais após a ingestão de quantidades relativamente pequenas de etanol. Esse acúmulo é resultado da inibição tanto do ciclo do ácido tricarboxílico como da oxidação de gordura, em parte devido à geração excessiva de NADH produzida pelas ações das desidrogenases do álcool e do aldeído (Lieber, 1994).

Concluindo, os resultados do presente estudo reforçam o papel antioxidante do suco de uva e do vinho tinto. Especialmente, o suco de uva é excelente alternativa ao vinho tinto neste modelo de dieta rica em colesterol.

## 5. CONCLUSÃO

Os compostos fenólicos presentes no vinho tinto e no suco de uva demonstram ação importante como antioxidantes *in vivo* reduzindo a peroxidação lipídica e restaurando os níveis de tióis não-protéicos em ratos adultos. O etanol, considerado como pró-oxidante, apresentou neste trabalho função antioxidante ao reduzir os níveis de peroxidação lipídica e ao restaurar a capacidade antioxidante em ratos adultos. Contudo, observa-se que os efeitos do etanol podem trazer danos significativos ao fígado dos ratos, uma vez que inibe a ação de substâncias reguladoras do metabolismo hepático dos lipídios.

O suco de uva apresentou ótimos resultados sendo capaz de diminuir danos nas células hepáticas e melhorar a histomorfologia do fígado dos ratos. Desta maneira, pode ser considerado promissora alternativa ao vinho tinto.

## 6. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Avaliar *in vitro* os efeitos antioxidantes dos polifenóis do vinho tinto e suco de uva em amostras humanas;
- Desenvolver modelo experimental de aterosclerose em coelhos utilizando gema de ovo como fonte de colesterol na dieta e comparar os efeitos antioxidantes do vinho tinto e do suco de uva nos animais;
- Avaliar os efeitos antioxidantes do vinho tinto e do suco de uva em modelos experimentais voltados para outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, diabetes, mal de Alzheimer, etc.
- Avaliar o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de diferentes amostras de vinhos e sucos de uva da região Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJMO, J. M. et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, p. 833-842, 2008.

AMERINE, M. A.; JOSLYN, M. A. **Table wines: The technology of their production**. 2<sup>nd</sup>. ed. Londres: University of California Press, 1970, 997p.

BARATA SOARES, A. D., et al. Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 147-154, 2004.

BARGALLÓ, M. V. et al. Moderate red wine consumption partially prevents body weight gain in rats fed a hiperlipidic diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 139-142, 2006.

BERTOLAMI, M. C.; BERTOLAMI, V. A hipercolesterolemia e as demais hiperlipidemias. **Revista Brasileira de Medicina**, v.43, n.5, p.112-121, 1986.

BLEYS, J. et al. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 4, p. 880-887, 2006.

BORS, W.; SARAN, M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. **Free Radical Research Communications**, v. 2, p. 289-294, 1987.

BRANDÃO, P. A. et al. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Agropecuária Técnica**, v.26, n.1, p.5–14, 2005.

BRAVO, L. Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BURNS, J. et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220-230, 2000.

BURNS, J. et al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5797-5808, 2001.

DANI, C. et al. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically - or conventionally - produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2574-2580, 2007.

DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**, v. 93, p. 325-330, 2005.

DAWSON V. L.; DAWSON T. M. Nitric oxide neurotoxicity. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 10, p.179–190, 1996.

DOUGLAS, C. R. Fisiologia das lipoproteínas plasmáticas. In:\_\_\_\_. CISTERNAS, J. R. **Tratado de fisiologia aplicada à nutrição**. São Paulo: Ed. Robe, p. 159-166, 2002.

FICKERT, P.; ZATLOUKAL, K. Pathogenesis of alcoholic liver disease. In:\_\_\_\_. **Handbook of Alcoholism**. Boca Raton: CRC Press, p. 317-323, 2000.

FLEMING, M.; MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. Etanol. In:\_\_\_\_. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10<sup>a</sup> ed. New York: Eds. M.J. Wonsiewies & P. Mc Curdy, p. 325-364, 2001.

FOLTS, J. D. Inhibition of platelet activity in vivo by amlodipine alone and combined with aspirin. **International Journal of Cardiology**, v. 62, n. 2, p. S111-S117, 1997.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

FRANKEL, E. N. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, v. 341, p. 454-457, 1993.

FREDERIKSEN, H. et al. Dietary supplementation with an extract of lycopene-rich tomatoes does not reduce atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n.1, p. 6-10, 2007.

GLÓRIA, M. B. A. et al. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 49, p. 279-282, 1998.

GROENBACK, M. et al. Influence of sex, age, body mass index, and smoking on alcohol intake and mortality. **British Medical Journal**, v. 308, p. 302-306, 1994.

GUASSI, S. A. D.; SALGADO, J. M.; LANNA, D. P. D. Perfil lipídico de ovos desidratados com ênfase no teor de gorduras trans. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 247-250, 2008.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system, **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609–1623, 1992.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, p. 255-257, 1999.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HERTOG, M. G. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, v. 342, p. 1007-1011, 1993.

HILLBOM, M.; JUVELA, S.; KARTTUNEN, V. Mechanisms of alcohol-related strokes. In: \_\_\_\_\_. **Alcohol and Cardiovascular Diseases**. Chichester: Ed. Goode, J., p. 193, 1998.

JACKSON, R. S. **Wine science: Principles and applications**. San Diego: Academic Press, 1994. 475 p.

JALDIN, R. G. et al. O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos a dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 5, n. 4, p. 247-256, 2006.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 257, p. 218-220, 1997.

KACHANI, A. T.; BRASILIANO, S.; HOCHGRAF, P. B. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, supl. 1, p. 21-24, 2008.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 1, p.1-17, 2006.

KÁLMAN, J. et al. High cholesterol diet down regulates the activity of activator protein-1 but not nuclear factor-kappa B in rabbit brain. **Life Science**, v.68, p.1495-1503, 2001.

KAMAL-ELDIN, A., et al. Effects of dietary phenolic compounds on tocopherol, cholesterol and fatty acids in rats. **Lipids**, v. 35, n. 4, p. 427-435, 2000.

KANNEL, W. B.; WILSON, P. W. F. An update on coronary risk factors. **Medical Clinics of North American**, v. 79, n. 951, p. 1050-1057, 1995.

KANNER, J. et al. Natural antioxidants in grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 64-69, 1994.

KAO, Y. H.; HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. **Endocrinology**, v. 141, n. 3, p. 980–987, 2000.

KOES, R. E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. **BioEssays**, v. 16, p. 123-132, 1994.

KRISHNA, M. C. et al. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of superoxide or as superoxide dismutase mimics? **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 26026-26031, 1996.

LIEBER, C. S. Alcohol and the liver: 1994 update. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1085-1105, 1994.

LIMA, F. E. L. et al. Ácidos Graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 73-80, 2000.

MACLURE, M. Demonstration of deductive meta-analysis: ethanol intake and risk of myocardial infarction. **Epidemiologic Reviews**, v. 15, p. 328-351, 1993.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MAMEDE, M. E. O.; CARDELLO, H. M. A. B.; PASTORE, G. M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: sensory and gas chromatography analysis of fermented grape musts. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 63-68, 2005.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim da CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MARTINET, W. et al. Oxidative DNA Damage and Repair in Experimental Atherosclerosis Are Reversed by Dietary Lipid Lowering. **Circulation Research**, v. 88, p. 733-739, 2001.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

MONTILLA, P. et al. Effect of red wine on oxidative stress and hipercolesterolemia induced by feeding a high-cholesterol diet in rat. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 259-264, 2004a.

MONTILLA, P. et al. Protective effect of Montilla-Moriles appellation red wine on oxidative stress induced by streptozotocin in the rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 688-693, 2004b.

MONTILLA, P. et al. Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 146-153, 2006.

MOSCA, L. et al. Clinical predictors of oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary artery disease. **American Journal of Cardiology**, v.90, p.825-830, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OSMAN, H. E. et al. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2307-2312, 1998.

OTERO, P.; HERRERA, E.; BONET, B. Dual effect of glucose on LDL oxidation: dependence on vitamin E. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1133-1140, 2002.

PASQUALUCCI, C.; UINT, L.; LAGE, S. G. Aterosclerose – Parte 2: Papel dos lípidos e lipoproteínas na aterosclerose. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 1, n. 2, p. 62-67, 1999.

PARI, L., SURESH, A. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.1627–1634, 2008.

PEREIRA, C. N.; DAUDT, C. E. Uréia: sua determinação e presença em vinhos brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, p. 40-42, 1995.

PEYNAUD, E. A. **Conhecer e trabalhar o vinho**. 3. ed. Lisboa: LTC, 1982, 347p.

RIBEIRO, K. C.; SHINTAKU, R. C. O. A influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. **ConScientiae Saúde**, v. 3, p. 73-83. São Paulo: UNINOVE, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIMM, E. B. et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. **Lancet**, v. 339, p. 464-468, 1991.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Concentração de ácido tartárico dos vinhos da Serra Gaúcha. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31. n. 5, p.893-895, 2001.

ROMERO-PEREZ, A. I. et al. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1533-1536, 1999.

SAINI, H. K.; ARNEJA, A. S.; DHALLA, N. S. Role of cholesterol in cardiovascular disfunction. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 20, p. 333-346, 2004.

SALVADOR, M.; DALLA SANTA; P. Teores de macronutrientes e colesterol em diferentes tipos de ovos. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 133-140, 2002.

SANTOS, S. da C.; MELLO, J. C. P. de. Taninos. In:\_\_\_\_\_. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2000, 821p.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3148-3151, 1997.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing Co. Inc., 1995, 331p.

SHANMUGANAYAGAM, D. et al. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 190, p. 135–142, 2007.

SHUKITT-HALE, B. et al. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. **Nutrition**, v. 22, p. 295–302, 2006.

SIES, H. What is oxidative stress? In:\_\_\_\_\_. Keaney, J. F. Jr., ed. **Oxidative stress and vascular disease**. Boston: Kluwer Academic Publishers, p. 1-8, 2000.

SOUZA, L. M. B.; GARCIA, M. A. A. Fatores de risco e prevenção das cardiopatias isquêmicas: revisão de literatura. **Revista Ciência Médica**, v. 5, n. 1, p. 24-29, 1996.

STEIN, J. H. et al. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 100, p. 1050–1055, 1999.

SUTER, P. M.; HASLER, E.; VETTER, W. Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: is alcohol a risk factor for obesity? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 5, p. 157-171, 1997.

TEBIB, K.; BESANC, O. N. P.; ROUANET, J. M. Effects of dietary grape seed tannins on rat cecal fermentation and colonic bacterial enzymes. **Nutrition Research**, v. 16, p. 105–110, 1996.

TOLINS, J. P.; STONE, B. G.; RAIJ, L. Interactions of hypercholesterolemia and hypertension in initiation of glomerular injury. **Kidney International**, V. 41, p. 1254-1261, 1992.

VIEIRA, E. C. Os Valores do Ovo. **Avicultura Industrial**, Campinas, v. 90, n. 1076, p. 17-19, 2000.

VILLAÑO, D. et al. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, p. 391-398, 2005.

VINSON, J. A. et al. Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p. 2798–2799, 1995.

VINSON, J. A. et al. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful *in vitro* antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after *ex vivo* spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2502–2504, 1999.

VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, v. 156, p. 67-72, 2001.

VOGT, E. et al. **El vino: Obtención, elaboración y análisis**. Zaragoza: Acribia S. A., 1986. 294p.

WAGNER, C. et al. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. **Brain Reserach**, v. 1107, p. 192-198, 2006.

WAITZBERG, D. L.; BORGER, V. C. Gorduras. In:\_\_\_\_. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 55-78, 2002.