

FABIOLA TEIXEIRA AZEVEDO

**EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE VINHO TINTO, VINHO BRANCO
E SUCO DE UVA LIOFILIZADOS, NA AORTA E FÍGADO DE COELHOS
ADULTOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de
Doctor Scientiae.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A994e
2011

Azevedo, Fabiola Teixeira, 1975-

Efeito da ingestão crônica de vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, na aorta e fígado de coelhos adultos hipercolesterolêmicos / Fabiola Teixeira Azevedo. – Viçosa, MG, 2011.

xvii, 136f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Vinho. 2. Polifenóis. 3. Resveratrol. 4. Aterosderose.
5. Oxido nítrico. 6. Imunofluorescência. 7. Vinho - Efeitos fisiológicos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

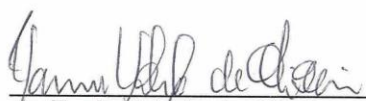
CDD 22. ed. 641.2223

FABIOLA TEIXEIRA AZEVEDO

**EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE VINHO TINTO, VINHO BRANCO
E SUCO DE UVA LIOFILIZADOS, NA AORTA E FÍGADO DE COELHOS
ADULTOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 16 de agosto 2011.


Tania Toledo de Oliveira
(Coorientadora)


Sérgio Luis Pinto da Matta
(Coorientador)


Clovis Andrade Neves


Michele Corrêa Bertoldi


Paulo Cesar Stringheta
(Orientador)

A Deus, por sua infinita bondade.

Ao meu filho Miguel, presente de Deus em minha vida.

Ao meu marido José Carlos, pelo incentivo ao meu ideal, pelo encorajamento nos momentos difíceis, pelo companheirismo de todas as horas e pelo amor verdadeiro.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- A meu orientador, Paulo César Stringheta, pelos valiosos ensinamentos transmitidos. Agradeço por sua excelente orientação, paciência e amizade.
- Aos meus coorientadores, Tania Toledo e Sérgio da Matta, pela colaboração imprescindível para a realização deste trabalho, amizade e atenção dispensada.
- Ao professor, Clóvis Andrade Neves do Departamento de Biologia Geral da UFV, pela orientação nas análises de imunofluorescência e amizade.
- Ao professor, José Francisco da Silva do Departamento de Zootecnia da UFV, pela generosidade e atenção dispensada.
- Ao professor, Paulo Cecon do Departamento de Estatística da UFV, pelas valiosas análises estatísticas e boa vontade dispensada.
- Ao professor, José Lino Neto do Departamento de Biologia Geral da UFV, pelo auxílio na obtenção das fotografias das artérias.
- Aos meus irmãos, Marco Aurélio e Andressa; à minha cunhada Suzana, pelas palavras de incentivo e carinho.
- Ao meu sobrinho Lucas, por alegrar a minha vida.
- Aos meus sogros Carlinhos e Lenir, pelas orações, apoio e carinho em todos os momentos.
- Às minhas chefes Ana Lúcia (Prefeitura Municipal de Campos dos Goytacazes-R.J.) e Elaine Ibrahim (Faculdade Redentor), pelo apoio e credibilidade em todos os momentos.
- Aos estagiários Igor, Larissa e Bia pelo comprometimento, suporte e amizade em todas as horas.

- Aos funcionários da UFV Luís Marcio, José Geraldo, Alex e Valério, pela boa vontade, paciência e orientação durante as análises.
- A todos os colegas e amigos do laboratório, Fernanda Rocha, Fernanda, Roberta Leoni, Manoela, Pollyanna, Paula, Isadora e Igor pela troca de experiências, amizade, pelos momentos de descontração (boas risadas) e pelo carinho.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

Fabiola Teixeira Azevedo, filha de José Luiz de Azevedo e Ilma Teixeira de Azevedo, nasceu em Bom Jesus do Itabapoana, Estado do Rio de Janeiro, em 11 de fevereiro de 1975.

Em agosto de 2000, graduou-se em Nutrição pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Em agosto de 2001, iniciou o curso de mestrado em Ciência de Alimentos no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Rio de Janeiro – R.J., concluindo-o em dezembro de 2003.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 VINHO TINTO E BRANCO.....	5
3.2 SUCO DE UVA.....	10
3.3 ESTATINA.....	13
3.4 POLIFENÓIS.....	15
3.4.1 ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLIFENÓIS.....	15
3.4.2 FONTES DOS POLIFENÓIS.....	17
3.4.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS POLIFENÓIS.....	19
3.4.4 METABOLISMO DOS POLIFENÓIS.....	20
3.4.4.1 ABSORÇÃO.....	21
3.4.4.2 DEGRADAÇÃO DOS POLIFENÓIS PELA MICROBIOTA INTESTINAL.....	22
3.4.4.3 BIOTRANSFORMAÇÃO.....	23
3.4.4.4 BIODISPONIBILIDADE.....	24
3.4.5 POLIFENÓIS E SAÚDE HUMANA.....	26
3.5 RESVERATROL.....	27
3.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	29
3.6.1 ESTRESSE OXIDATIVO NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS.....	32
3.7 COLESTEROL.....	34
3.7.1 LIPOPROTEÍNAS.....	36
3.7.1.1 QUILOMÍCRONS.....	37
3.7.1.2 VLDL.....	38
3.7.1.2 LDLs.....	38
3.7.1.4 HDL.....	39
3.8 PERFIL LIPÍDICO.....	39
3.8.1 HIPERCOLESTEROLEMIA.....	40
3.9 FUNÇÃO ENDOTELIAL E DOENÇA CARDIOVASCULAR.....	41
3.9.1 FORMAÇÃO DA PLACA DE ATEROMA.....	43
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

CAPÍTULO 1 - EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE VINHO TINTO, VINHO BRANCO E SUCO DE UVA LIOFILIZADOS, RESVERATROL E SINVASTATINA NA AORTA DE COELHOS ADULTOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS.....	61
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4 CONCLUSÃO.....	98
5 REFERENCIAS.....	99
 CAPÍTULO 2 - EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE VINHO TINTO, VINHO BRANCO E SUCO DE UVA LIOFILIZADOS, RESVERATROL E SINVASTATINA NO FÍGADO DE COELHOS ADULTOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS.....	 104
1 INTRODUÇÃO.....	104
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	106
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
4 CONCLUSÃO.....	124
5 REFERÊNCIAS.....	125
 5 CONCLUSÕES GERAIS.....	 128
APENDICE.....	129

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

- μmol – micro mol
- $^1\text{O}_2$ - oxigênio *singlete*
- ACAT₂ - acil-CoA colesterol aciltransferase
- ALT – alanina transferase
- AST – aspartato transferase
- BH₄ - tetra-hidrobiopterina
- Ca⁺⁺ - cálcio livre
- CAT - catalase
- CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CMLs – células musculares lisas
- CoA – coenzima A
- DAC - doença arterial coronariana
- DBBM – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
- DBG – Departamento de Biologia Geral
- DCNT- Doenças crônicas não transmissíveis
- DCV – doenças cardiovasculares
- DNA – deoxyribonucleic acid
- DTA – Departamento de Tecnologia de Alimentos
- EAG - equivalente de ácido gálico
- eNOS - óxido nítrico sintase endotelial
- ERNS - espécies reativas de nitrogênio
- EROS - espécies reativas de oxigênio
- FAD – flavina adenina dinucleotídeo
- FMN – flavina mononucleotídeo
- GCa - guanilato ciclase
- GMPc - guanosina monofosfato cíclica
- GPx - glutathione peroxidase
- GSH – glutathione reduzida
- GSSG – glutathione oxidada
- GTP – guanosina trifosfato
- H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

- HDL - lipoproteínas de alta densidade
- HMG-CoA – Hidroxil-3-metilglutaril coenzima A
- HNO - nitrosil hidreto
- HOCl - ácido hipocloroso
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICAM – molécula de adesão intercelular
- IDL - lipoproteínas de densidade intermediária
- IL - interleucina
- iNOS - óxido nítrico-sintase induzida
- Kg – quilogramas
- L – litros
- LDLs – lipoproteína de baixa densidade
- LPL - lipase lipoprotéica
- MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos
- M-CSF – fator estimulador de colônias de macrófagos
- MEC – matriz extracelular
- mg – miligramas
- mL – mililitros
- MMP – metaloproteinases
- MONICA - Multinational Monitoring of trends and determinants in Cardiovascular disease
- MTP - proteína microssomal de transferência
- Na⁺ - sódio
- NADH - nicotinamide adenine dinucleotide
- NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- NFκB – fator nuclear *kappa* B
- NHA – N^G-hidroxi-L-arginina
- nmol – nano mol
- nNOS - óxido nítrico sintase neuronal
- NO - óxido nítrico
- NO₂[•] - dióxido de nitrogênio
- NOS – óxido nítrico sintase
- O₂⁻ - ânion superóxido
- O₃ - ozônio

- $\text{OH}^\bullet$ - radical hidroxila
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- ONOO^- - peroxinitrito
- ox-LDL - lipoproteína de baixa densidade oxidada
- PDG – fator de crescimento derivado das plaquetas
- SOD - superóxido dismutase
- TGF – α – fator de crescimento transformante alfa
- $\text{TNF-}\alpha$ – fator de necrose tumoral α
- UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
- USA - United States of America
- VCAM-1 – molécula de adesão da célula vascular
- VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade
- γ -GT - glutamyltranspeptidase

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 (Cap. 1):	Peso corporal médio (g) dos coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 71
Tabela 2 (Cap. 1):	Valores médios da concentração de proteínas totais (g/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 72
Tabela 3 (Cap. 1):	Valores médios da concentração de albumina (g/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 73
Tabela 4 (Cap. 1):	Valores médios da concentração de creatinina (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 75
Tabela 5 (Cap. 1):	Valores médios da concentração de colesterol total (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 76
Tabela 6 (Cap. 1):	Valores médios da concentração de triglicerídeo (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 79
Tabela 7 (Cap. 1):	Valores médios da concentração de LDL colesterol (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 80
Tabela 8 (Cap. 1):	Valores médios da concentração de HDL colesterol (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempos..... 81
Tabela 9 (Cap. 1):	Avaliação da área da lesão arterosclerótica..... 89
Tabela 10 (Cap. 1):	Análise da intensidade da expressão da enzima óxido nítrico sintase na artéria de coelhos em 50 dias de estudo..... 97
Tabela 1 (Cap. 2):	Valores médios da concentração dos lipídios plasmáticos totais (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, aos 50 dias de estudo..... 112

Tabela 2 (Cap. 2):	Valores médios da atividade de AST (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo.....	113
Tabela 3 (Cap. 2):	Valores médios da atividade de ALT (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo.....	114
Tabela 4 (Cap. 2):	Valores médios da atividade de γ -GT (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo.....	115
Tabela 5 (Cap. 2):	Valores médios da atividade de fosfatase alcalina (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo.....	116
Tabela 6 (Cap. 2):	Valores médios da atividade de lipase (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo.....	117
Tabela 7 (Cap. 2):	Média dos resultados morfométricos para hepatócitos, grandes vasos, sinusóides, infiltrado, gordura e células degeneradas no fígado de coelhos.....	123
Tabela 8 (Cap. 2):	Média dos resultados morfométricos para núcleo geral, diâmetro do núcleo, volume do núcleo no fígado de coelhos.....	123
Tabela 9 (Cap. 2):	Média dos resultados morfométricos para citoplasma, hepatócito com núcleo picnótico, volume citoplasma e volume hepatócito no fígado de coelhos.....	124

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 (Rev. Bibl.):	Fluxograma de produção de vinhos tintos e brancos...	7
Figura 2 (Rev. Bibl.):	Estrutura geral da molécula do flavonóide.....	16
Figura 3 (Rev. Bibl.):	Estruturas químicas das antocianinas.....	16
Figura 4 (Rev. Bibl.):	Estrutura básica dos estilbenos.....	17
Figura 5 (Rev. Bibl.):	Rota metabólica dos polifenóis da dieta em humanos.	21
Figura 6 (Rev. Bibl.):	Estrutura geral dos estilbenos e resveratrol e seus derivados.....	28
Figura 7 (Rev. Bibl.):	Mecanismo do Estresse Oxidativo.....	32
Figura 8 (Rev. Bibl.):	Esquematização do início da disfunção endotelial precursora da formação da placa aterosclerótica.....	44
Figura 9 (Rev. Bibl.):	Esquematização da progressão de uma placa aterosclerótica.....	45
Figura 10 (Rev. Bibl.):	Esquematização de uma placa aterosclerótica instável.....	46
Figura 1 (Cap. 1):	Artérias “en face” coradas com Sudan IV.....	83
Figura 2 (Cap. 1):	Análises histológicas das lesões arteriosclerótica nas artérias dos coelhos.....	85
Figura 3 (Cap. 1):	Fotomicrografias de amostras representativas das análises de imunofluorescência da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOs).....	90
Figura 1 (Cap. 2):	Fotomicrografias da seção do fígado de coelhos.....	119

RESUMO

AZEVEDO, Fabiola Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Efeito da ingestão crônica de vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, na aorta e fígado de coelhos adultos hipercolesterolêmicos.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Coorientadores: Tânia Toledo de Oliveira e Sérgio Luís Pinto da Matta.

Os compostos fenólicos são as maiores fontes de antioxidantes consumidos na dieta humana e estão distribuídos amplamente em frutas, hortaliças e bebidas como o chá, a cerveja, o suco de uva e o vinho. O consumo moderado de vinho tinto está associado com um risco reduzido de doenças cardiovasculares (DCV). Este fenômeno é baseado em dados de observações epidemiológicas conhecido como o paradoxo francês. O mecanismo que envolve a proteção do vinho nas DCV é bastante discutível, devido aos efeitos do álcool e dos componentes não alcoólicos do vinho. Os compostos fenólicos presentes no vinho tinto, vinho branco e suco de uva apresentam diferenças em sua composição e quantidade. O efeito cardioprotetor do vinho tinto é atribuído ao resveratrol, onde é encontrado em maior quantidade que no vinho branco e no suco de uva. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da ingestão diária de vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, resveratrol e estatina na aorta e fígado de coelhos adultos alimentados com ração hipercolesterolêmica. Foram utilizados 35 coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia, estes foram divididos ao acaso em sete grupos que receberam os respectivos tratamentos: Grupo I, 120 g de ração; Grupo II, 120 g de ração com 1% de colesterol; Grupo III, 120 g de ração com 1% de colesterol e 10mg de sinvastatina; Grupo IV, 120 g de ração com 1% de colesterol e 1mg de resveratrol; Grupo V, 120 g de ração com 1% de colesterol e 4mL de vinho tinto liofilizado; Grupo VI, 120 g de ração com 1% de colesterol, 4mL de vinho branco liofilizado; Grupo VII, 120 g de ração com 1% de colesterol, 7,8mL de suco de uva integral liofilizado. Esses foram submetidos a três coletas de sangue; antes de iniciar o estudo experimental, com 25 dias e 50 dias, neste último dia além do sangue foram coletados os tecidos. As análises sanguíneas foram realizadas por método colorimétrico, foi avaliado colesterol total (CT),

lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triacilgliceróis, proteínas totais, albumina, creatinina, aspartato transferase (AST), alanina transferase (ALT), gama-GT, fosfatase alcalina e lipase. Análises histológicas foram realizadas nas artérias e fígados. Imunofluorescência foi realizada para verificar a expressão da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) na artéria. Os grupos que receberam uma dieta rica em colesterol apresentaram níveis sanguíneos significativamente aumentados de colesterol total, indicando a eficiência do acréscimo de 1% de colesterol na ração dos coelhos na indução da hipercolesterolemia. O vinho tinto aumentou significativamente o HDL em relação ao resveratrol no período de 50 dias. O resveratrol foi mais eficiente do que o suco de uva na redução ($P \leq 0,05$) do triglicérido aos 50 dias do estudo experimental. A estatina preveniu a formação de células espumosas na artéria, contudo não induziu maior expressão da eNOS. Os vinhos tinto e branco liofilizados apresentaram melhor indução da eNOS comparados a todos os tratamentos. As enzimas hepáticas AST e ALT foram significativamente menores no grupo tratado com vinho tinto liofilizado do que no grupo tratado com estatina no período de 25 dias. Nossos resultados não foram conclusivos para afirmar o efeito do uso crônico do vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, estatina, resveratrol e na prevenção à danos hepáticos. Nosso trabalho sugere que os mecanismos de proteção para as doenças arterial coronariana são distintos para estatina, resveratrol e os polifenóis dos vinhos tinto, branco e suco de uva, sem afetar os níveis plasmáticos de colesterol e LDL-c.

ABSTRACT

AZEVEDO, Fabiola Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Effect of Chronic Ingestion of Lyophilized Red Wine, Lyophilized White Wine e Lyophilized Grape Juice in the Aorta and Liver in Adults Hypercholesterolemic Rabbits.** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Co-advisers: Tânia Toledo de Oliveira and Sérgio Luís Pinto da Matta.

The phenolic compounds are the major sources of antioxidants consumed in the human diet and are widely distributed in fruit, vegetables and beverages such as tea, beer, grape juice and wine. The moderate consumption of red wine is associated with a reduced risk of cardiovascular diseases (CVDs). This phenomenon is based on data from epidemiological observations known as the french paradox. The mechanism that involves the wine's protective effect in CVD is highly questionable, due to the effects of alcohol and the non-alcoholic components of wine. The phenolic compounds present in red wine, white wine and grape juice have differences in their composition and quantity. The cardioprotective effect of red wine is attributed to the resveratrol, which is found in higher numbers than in white wine and grape juice. The objective of this study was to verify the effect of daily intake of lyophilized red wine, lyophilized white wine and lyophilized grape juice, resveratrol and statins in aorta e liver in adult rabbits fed with hypercholesterolemic ration. 35 male albino rabbits from New Zealander race, the animals were divided at random into seven groups that received 10mg of simvastatin, 1mg of resveratrol, 4mL of lyophilized red wine , 4mL of lyophilized white wine and 7.8 ml of lyophilized whole grape juice. These were submitted to three blood samples collection; before starting the experimental study, with 25 days and 50 days, on this last day in addition to the blood, tissues were also collected. Blood analyzes were performed by a colorimetric method. It was assessed total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), tryacylglycerols, total protein, albumin, creatinine, aspartate transferase (AST), alanine transferase (ALT), gamma-GT, alkaline phosphatase and lipase. Histological analyzes were performed in the arteries and liver. Immunofluorescence was performed to verify the expression of the

enzyme nitric oxide synthase (eNOS) in the artery. The groups which received a cholesterol rich diet showed blood levels significantly increased of total cholesterol, indicating the efficiency of the addition of 1% of cholesterol in the habit's ration on induction of hypercholesterolemia. The red wine significantly increased the HDL in relation to the resveratrol in the period of 50 days. The resveratrol was more efficient than the grape juice in the reduction ($p \leq 0.05$) of the triglyceride at 50 days of experimental study. The statin prevented the formation of foam cells in the artery, however failed to induce greater expression of eNOS. The red and white lyophilized wines presented better induction of eNOS compared to all treatments. The liver enzymes AST and ALT were significantly lower in the group treated with alcohol-free red wine than in the group treated with statins in the period of 25 days. Our results weren't conclusive to affirm the effect of chronic intake of red wine, white wine and lyophilized grape juice, statin, resveratrol in the prevention of liver damages. Our work suggests that the mechanisms of protection for the coronary artery diseases are distinct for statin, resveratrol and the polyphenols in red wine, white and grape juice, without affecting the plasma levels of cholesterol and LDL-c levels.

1 INTRODUÇÃO

Polifenóis são grupos complexos de moléculas presentes em muitas plantas. Milhares de moléculas têm sido identificadas em várias espécies de plantas e atualmente são conhecidas mais de 8000 estruturas de polifenóis (SCALBERT *et al.*, 2002; ZERN e FERNANDEZ, 2005; RAHMAN *et al.*, 2006). Esses componentes são os maiores grupos de fitoquímicos e possuem grande importância fisiológica e morfológica em plantas e no organismo humano (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

Os polifenóis estão divididos em flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides mais comuns são os flavonóis (quercetina, canferol e miricetina), 3-flavanóis (catequina, epicatequina, taninos) e antocianinas. Os polifenóis se encontram livres ou conjugados a açúcares (glicosídeos), a outros flavonóides e a não-flavonóides (PENNA *et al.*, 2001).

Os não flavonóides, fenóis com um anel aromático, são derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido caféico, ácido *p*-cumárico) e ácido hidroxibenzóico (ácido gálico). Outra classe de não-flavonóides em produtos provenientes das uvas são os estilbenos e glicosídeos de estilbenos, sendo o *trans*-resveratrol o mais conhecido (GOLDE *et al.*, 2004).

A estrutura química dos fenóis é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associados diretamente à estrutura cíclica (MAMEDE e PASTORE, 2004). Sua estrutura química favorece sua atividade antioxidante, que está associada à ação biológica. A atividade antioxidante dos polifenóis proporciona o seqüestro de radicais livres e algumas vezes quelam metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002).

A produção excessiva de radicais livres pode ultrapassar a capacidade antioxidante de enzimas como a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase e de compostos antioxidantes que incluem a glutathione, o tocoferol e o ácido ascórbico. Como consequência, proteínas, lipídios e DNA (Deoxyribonucleic acid) poderão ser alvos de ataque dos radicais livres, levando à desestruturação de enzimas, membranas celulares e material genético. Sendo uma das causas das

doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), os radicais livres estão envolvidos em mais de cem tipos de doenças (TEDESCO *et al.*, 2001; STINTZING e CARLE, 2004; GÜLÇİN, 2010).

Os compostos fenólicos são as maiores fontes de antioxidantes consumidos na dieta humana e estão distribuídos amplamente em frutas, hortaliças e em bebidas como, chá, cerveja, suco de uva e vinho (TEDESCO *et al.*, 2001; RODEIRO *et al.*, 2008). O consumo diário de polifenóis pode atingir 1 g, o que é maior que o consumo de todos os outros fitoquímicos classificados como antioxidantes (CERQUEIRA *et al.*, 2007). Ao serem ingeridos podem ser absorvidos no intestino delgado ou no cólon e excretados nas fezes e urina. O sítio e a taxa de absorção dependem da estrutura química (ZERN e FERNANDEZ, 2005).

Estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo de alimentos e bebidas ricos em polifenóis diminui o risco DCNT, principalmente as de maior incidência na população mundial como doenças neurodegenerativas, câncer e doenças cardiovasculares (MANACH *et al.*, 2004; TSUCHIYA, 2010). Estes estudos demonstram, com evidência convincente, que altas ingestões de polifenóis diminuem a mortalidade por doença arterial coronariana em mais de 65% dos indivíduos e geralmente diminuem o risco de infarto, assim como, de alguns tipos de câncer (PETTI e SCULLY, 2009).

Um estudo bastante citado na literatura científica, conhecido como *Paradoxo Francês*, evidenciou que franceses que consumiam cerca de 14% a 15% do total energético da dieta na forma de gordura saturada e apresentavam níveis de colesterol sanguíneo elevados, semelhantes aos dos americanos e ingleses, tinham incidência de mortalidade por enfermidades cardiovasculares tão baixa quanto a dos japoneses e chineses (BRIDLE e TIMBERLAKE, 1997; DELGADO-VARGAS, 2000; COSTA, 2003).

Posteriormente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) confirmou pelo projeto MONICA (Multinational Monitoring of trends and determinants in Cardiovascular disease) que o nível de mortalidade provocado pelas doenças cardiovasculares era muito menor na França do que em outros países. Esse efeito foi atribuído aos polifenóis do vinho tinto consumido pelos indivíduos franceses, que diminuía a oxidação das lipoproteínas

de baixa densidade (LDLs) e a formação de trombos nessa população francesa. Um componente fenólico naturalmente presente no vinho tinto é o resveratrol que é apontado por muitos estudos o responsável principal pelas propriedades benéficas do vinho contra as doenças cardiovasculares (BERROUGUI *et al.*, 2009; DAS e DAS, 2010; BORRIELLO *et al.*, 2010).

As bebidas alcoólicas como o vinho tinto, principalmente, apresentam outras substâncias além do etanol que favorecem a modulação do processo bioquímico prevenindo a doença coronariana vascular. Um estudo epidemiológico realizado com adultos da Carolina do Norte (USA) demonstrou que o vinho branco e o tinto reduziram o risco de morte quando comparado a outras bebidas alcoólicas como licor e cerveja (KLATSKY *et al.*, 2003).

Portanto, o vinho é destacado entre outras bebidas, devido sua associação com estudos epidemiológicos, demonstrando ter mais efeito benéfico na redução do risco de morte por doenças coronarianas do que outras bebidas alcoólicas (PACE-ASCIAC *et al.*, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da ingestão diária de vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, resveratrol e estatina em aortas e fígado de coelhos adultos alimentados com ração hipercolesterolêmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o perfil lipídico e o perfil hepático no plasma sanguíneo dos grupos de animais que receberam doses diárias de vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, resveratrol e estatina.

Verificar o efeito dos diferentes tratamentos nas células hepáticas, na formação de placas aterosclerótica na camada íntima da aorta e na expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial dos animais estudados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 VINHO TINTO E BRANCO

Segundo a legislação brasileira, vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. Os vinhos podem ser classificados quanto à classe, à cor e ao teor de açúcar. Quanto à classe, em vinho de mesa, leve, fino, espumante, frisante, gaseificado, licoroso e composto. Quanto à cor, em tinto, rosado (rosé ou clarete) e branco. Em relação ao teor de açúcar, em nature, extra-brut, brut, seco (sec ou *dry*), meio doce (meio seco ou demi-sec), suave e doce (BRASIL, 1988).

As inúmeras variedades de uvas para a elaboração de vinho podem ser divididas em duas categorias: uvas para vinhos finos e uvas para vinhos comuns. As uvas para vinhos finos são as *Vitis vinifera* (superior) e as uvas para vinhos comuns são a *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos (HASHIZUME, 2001).

As variedades de uvas da espécie *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos são (HASHIZUME, 2001):

1. *Vitis vinifera*

Tintas: Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Pinot Noir, Bonarda, Sangiovese, Canaiolo, Syrah e Tannat.

Branças: Riesling Renano, Riesling Itálico, Chardonnay, Gewürztraminer, Malvasia, Pinot Blanc, Trebbiano, Peverella, Moscatel, Flora, Sauvignon Blanc e Semillon.

2. *Vitis labrusca*

Tintas: Isabel, Concord, Tercy, Bordô, Folha de Figo e York Madeira.

Branças: Niagara.

3. *Vitis bourquina*

Tintas: Hebermont e Jaques.

4. Híbridas:

Tintas: Seibel 2, Seibel 10.096, IAC 138-22 (Máximo), Pignoletta e Couderc.

Branças: Seyve Villard 5.276, IAC 116-31 (Rainha), IAC 21-14 (Madalena).

As variedades de uvas da espécie *Vitis vinifera* (casta nobre) produzem vinhos de categoria superior, e seu cultivo está limitado a algumas regiões vitivinícolas devido às condições de solo e clima favoráveis, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina e no nordeste brasileiro, na região do Vale São Francisco. As uvas da variedade *Vitis labrusca* são mais rústicas e podem ser cultivadas em qualquer região do Brasil. As variedades da espécie *Vitis bourquina* são cultivadas em Minas Gerais e Rio Grande do Sul. As uvas híbridas cultivadas no Brasil contribuem para a obtenção de vinhos comuns de melhor qualidade (HASHIZUME, 2001).

Existem no Brasil doze regiões responsáveis pela produção de vinhos, sucos de uva e derivados, onde são elaborados 350 milhões de litros de vinho e mosto por ano (MELLO, 2002; SAUTTER, 2005). O Brasil ocupa a 17ª posição no volume de produção mundial de vinho, representando 1,2%, com 262 milhões de litros/ano (MIELE *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, a maior produção de vinhos no Brasil é centralizada principalmente no Estado do Rio Grande do Sul. Nos últimos anos, com a expansão das áreas de cultivo de videiras para outras regiões e a preocupação com a qualidade dos produtos, esse cenário tem sofrido modificações. O foco na qualidade tem levado ao aumento no cultivo de videiras para a produção de vinhos finos, destacando-se as cultivares de *Vitis vinifera*, Cabernet Sauvignon, originárias da região de Médoc em Bordeaux, na França (FERREIRA *et al.*, 2004)

A maior diferença na fabricação do vinho tinto e branco está nas operações de pré-fermentação. Para produzir o vinho tinto, é utilizada a fermentação do suco e cascas, enquanto para o vinho branco a fermentação é somente do suco de uva prensada (Figura 1) (SILVA, 2003).

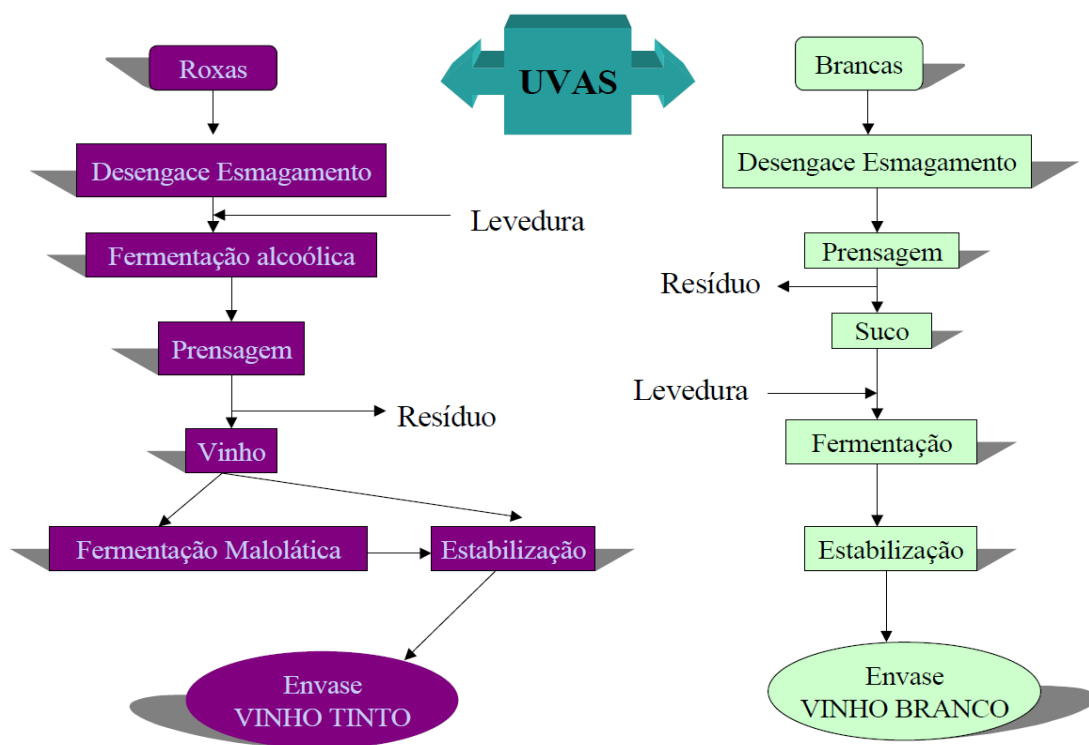


Figura 1: Fluxograma de produção de vinhos tintos e brancos (GIRARD e MAZZA, 1998).

O consumo de vinhos no Brasil é considerado baixo, cerca de 2,0 litros *per capita* no ano de 2005, em comparação com países tradicionalmente vinícolas como Itália e França, onde o consumo anual de vinhos pode alcançar 54 litros *per capita* (MACHADO, 2007).

O vinho é uma matriz complexa e pode ser considerado um fito-complexo. Muitas substâncias ativas têm sido identificadas, entre elas, os polifenóis (BERTELLI, 2007). Os polifenóis são importantes no parâmetro de qualidade dos vinhos, contribuindo nas características sensoriais como cor, adstringência e amargor, além de estarem associados à prevenção de DCNT (RIVERO-PÉREZ *et al.*, 2008).

O fator determinante na quantidade de polifenóis no vinho parece ser o tempo de fermentação em contato com as cascas das uvas, já que os polifenóis estão presentes em maior quantidade na casca e não na polpa do fruto. A quantidade de polifenóis no vinho tinto varia de 1000 a 3500 mg/L, dependendo da variedade da uva, cultivo, técnicas de fabricação e condições gerais do plantio, como incidência de luz solar e

pragas (VRHOVSEK *et al.*, 1997; RODRIGUES, 2005; SAURA-CALIXTO e DÍAZ-RUBIO, 2007).

Os principais polifenóis presentes no vinho são os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido ferúlico, os ácidos hidroxibenzoicos, como o ácido gálico, e os estilbenos, representado pelo resveratrol, que pertencem à classe dos não flavonoides. Fazem parte da classe dos flavonoides os flavonóis quercetina, miricetina, catequina, epicatequina e as antocianinas delphinidina e cianidina (FRÉMONT, 2000; SAURA-CALIXTO e DÍAZ-RUBIO, 2007).

A antocianina é um dos mais importantes componentes fenólicos do vinho tinto, contribuindo com a cor e efeitos antioxidantes (RIVERO-PÉREZ *et al.*, 2008). O teor total de antocianina no vinho tinto pode ser fortemente influenciado por fatores enológicos como a maceração. Um conteúdo representativo de antocianina está em torno de 400 mg/L em um vinho tinto com menos de 6 meses de envelhecimento e 90 mg/L quando envelhecido por mais de 2 anos. Os vinhos brancos contêm quantidades inexpressivas desse polifenol (DELL'AGLI *et al.*, 2004).

A concentração de antocianinas foi avaliada por Burns *et al.* (2000) em vinhos tintos Cabernet Sauvignon de várias safras e países, incluindo Chile, Estados Unidos, França, Espanha e Bulgária. As concentrações encontradas variaram de 11,00 a 32,57 mg/L.

O resveratrol é um polifenol sintetizado na casca da uva como resposta ao estresse causado por ataque de fungos (*Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticula*), dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta (NIKFARDJAM *et al.*, 2006; SAUTTER *et al.*, 2005; KASDALLAH-GRISSA *et al.*, 2007). A quantidade de resveratrol no vinho tinto varia consideravelmente. Uvas da variedade *Cabernet Sauvignon* cultivadas na região de Napa Valley, Califórnia, E.U.A. na safra de 1989, produziram vinhos que continham 0.09mg/L de resveratrol, enquanto no ano 1994, esta concentração foi de 8.9mg/L (BERTELLI, 2007).

Segundo Souto *et al.* (2001), os vinhos tintos no Brasil apresentam cerca de 0,82 a 5,75mg/L de *trans*-resveratrol, com um valor médio de 2,57mg/L. Vinhos produzidos em Hokkaido e Kyushu no Japão apresentaram teores médios de resveratrol de 4.37mg/L no vinho tinto e de 0.68mg/L no vinho branco (TOMERA, 1999).

Ao vinho branco é dada menor atenção do que ao vinho tinto devido à menor quantidade de polifenóis. Estudo em pacientes com doença arterial coronariana demonstrou que tanto o vinho tinto quanto o vinho branco melhoraram a função endotelial, não havendo diferença entre os dois tipos de vinho para modular a liberação de interleucina-6 no plasma sanguíneo (WILLIAMS *et al.*, 2004; KIKURA *et al.*, 2004).

Polifenóis e etanol parecem ser os componentes responsáveis pela baixa incidência de doenças cardiovasculares (SAURA-CALIXTO e DÍAZ-RUBIO, 2007; JIMÉNEZ *et al.*, 2007). Vários estudos mostraram que o vinho reduz o risco de desenvolvimento da aterosclerose, mas não apresenta efeito quando a doença foi desenvolvida (LUZ *et al.*, 1999; FU *et al.*, 2003; ZOU *et al.*, 2003; JIMÉNEZ *et al.*, 2007).

Em estudo de meta-análise, foi sugerido que 30g de álcool por dia, aproximadamente 320mL de vinho, poderiam causar o aumento do HDL em 8,3% (LEIGHTON *et al.*, 2000). Em estudo realizado com 44 homens adultos, que receberam uma dieta com alto teor de gordura e foram divididos em grupos que ingeriram 250mL de vinho branco, 250mL de vinho tinto, frutas e vegetais por três semanas, foi observado aumento nos níveis de HDL de 4% a 18% entre os grupos que receberam vinho. E o efeito do vinho tinto foi maior do que o do vinho branco (LEIGHTON e URQUIAGA, 2007).

De acordo com estudos epidemiológicos, o consumo de bebida alcoólica pode ser considerado baixo, moderado e alto. Menos de três drinques por dia é chamado de consumo baixo a moderado e três ou mais drinques por dia é considerado alto consumo. A idade, sexo e fatores individuais influenciam no efeito do álcool sobre o organismo (KLASTSKY, 2007). Estudos definem como ingestão moderada uma quantidade menor que 30g álcool/dia (LEIGHTON e URQUIAGA, 2007).

O consumo de bebida alcoólica sempre envolve perigo do ponto de vista médico. De acordo com o Relatório Mundial da Saúde de 2002, estima-se que o álcool seja a causa de 20% a 30% de doenças como câncer esofágico, câncer hepático, cirrose do fígado e epilepsia (BERTELLI, 2007). Esses riscos à saúde envolvendo o álcool não favorecem uma recomendação geral para a sua utilização (WHO, 2002).

As desvantagens para o alto consumo de vinho branco e tinto consistem em doenças orgânicas, alcoolismo, crime e erosão dental. Entre as doenças orgânicas, podem ser destacadas o refluxo gastresofágico causado, principalmente, pelo vinho branco, além de desconforto gástrico, enxaqueca, câncer gástrico, entre outras, pelo consumo do vinho tinto (TOMERA, 1999).

Entretanto, alguns estudos atribuem ao álcool um efeito protetor para as doenças cardiovasculares, pois aumenta a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e diminui os níveis de fibrinogênio e reatividade das plaquetas quando consumido de forma moderada. Porém, recentes estudos sugerem que o efeito protetor é devido à presença dos polifenóis em bebidas alcoólicas (BERTELLI, 2007; JIMÉNEZ *et al.*, 2007).

3.2 SUCO DE UVA

Segundo a legislação vigente do Ministério da Agricultura, suco de uva é a bebida não fermentada, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado, de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988). Normatiza suco de uva integral, suco de uva reprocessado, suco de uva concentrado e suco de uva desidratado.

O suco de uva pode ser classificado de acordo com os processos de obtenção e constituição em:

1. Suco de uva concentrado: suco parcialmente desidratado, sendo vedada a adição de açúcar.
2. Suco de uva reprocessado ou reconstituído: suco obtido através da reidratação do suco concentrado até a concentração original. Pode ser adicionado de açúcar em quantidade máxima equivalente a 10% dos açúcares naturais, quando então será designado suco de uva reprocessado e adoçado.

3. Suco de uva desidratado: suco de uva em forma sólida obtido pela desidratação do suco de uva, cujo teor de umidade não deverá ultrapassar 3%.

4. Suco de uva integral: suco de uva na concentração natural, sem qualquer adição de açúcar.

5. Suco de uva adoçado: suco de uva adicionado de açúcar em quantidade máxima equivalente a 10% de açúcares naturais.

No Brasil, são identificados dois processos básicos de produção de suco de uva, que se diferenciam pelo modo de extração (SAUTTER *et al.*, 2005). Um dos processos prevê a maceração sulfurosa da uva esmagada para extração de cor, a separação do suco sulfitado, conservação em tanques até o momento da comercialização, quando é dessulfitado e engarrafado (processo Flanzy). Apesar de ser um processo simples e econômico, hoje tem menor utilização em razão da perda de qualidade do suco e dos problemas ambientais decorrentes da separação dos sulfitos (VENTURINI FILHO, 2005).

O outro processo, conhecido por Welch, prevê a extração por aquecimento da uva, separação do suco, estabilização, engarrafamento ou armazenagem em tanques. Esse procedimento tem o potencial de produzir produtos de melhor qualidade organoléptica e sem resíduos de sulfitos (VENTURINI FILHO, 2005).

As etapas do processamento do suco de uva tais como tipo de extração, tempo de contato entre o suco e as partes sólidas da uva (casca e sementes), prensagem, tratamentos térmicos, tratamentos enzimáticos e adição de dióxido de enxofre e ácido tartárico podem interferir na quantidade total dos compostos fenólicos no suco processado (MALACRIDA e MOTTA, 2005; MALACRIDA e MOTTA, 2006).

O suco de uva é uma relevante fonte de compostos polifenólicos, e a quantidade e o tipo destes compostos são semelhantes ao da uva fresca. Os principais polifenóis encontrados em suco de uva concentrado são miricetina, quercetina, procianidina, catequinas, antocianinas e *trans*-resveratrol (DÁVALOS *et al.*, 2006).

Nas uvas tintas, as antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos (ABE *et al.*, 2007). As principais variedades de uvas utilizadas na produção de suco no Brasil são a Concord, Isabel,

Bordô e Jacquez, sendo as duas últimas mais ricas em compostos antociânicos (MALACRIDA e MOTTA, 2005).

Em estudo desenvolvido por Dani *et al.* (2007), foi comparado o teor de antocianinas em sucos de uva convencional e orgânico de cultivares de uvas *Vitis labrusca* da região Sul do Brasil. O suco orgânico apresentou maior concentração de antocianinas quando comparado ao convencional, apresentando concentrações de 289,76 mg/L e 108,71 mg/L, respectivamente.

Malacrida e Motta (2005) analisaram o teor de fenólicos totais de oito marcas de sucos de uva reconstituídos e doze marcas de diferentes sucos de uva tintos simples, obtidos no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte. Os teores de compostos fenólicos totais variaram entre 0,27 e 1,32 g/L nos sucos de uvas reconstituídos e entre 0,60 e 2,41 g/L nos sucos de uva simples. A concentração média de antocianinas nos sucos de uva reconstituídos variou de 2,13 a 36,23 mg/L e de 1,17 a 66,80 mg/L nos sucos de uva simples.

O método de prensagem no processo de produção de suco de uva tem grande efeito sobre a formação de resveratrol, mas a maior influência é da cultivar. Sautter *et al.* (2005) avaliaram o teor de *trans*-resveratrol em amostras de sucos de uva de onze marcas comerciais diferentes produzidos em várias regiões do Brasil. As amostras foram subdivididas, segundo a classificação do tipo de suco, em suco de uva integral, suco de uva reprocessado, suco de uva reconstituído e adoçado e néctar de uva. Os sucos de uva integral e o néctar de uva apresentaram concentração média de resveratrol de 0,41 mg/L. As marcas de suco integral apresentaram um coeficiente de variação maior, pois devido à legislação brasileira o suco de uva integral deve manter a concentração natural. O suco reprocessado apresentou valor médio de 0,75 mg/L, e o suco reconstituído e adoçado, de 0,25 mg/L.

Estudos epidemiológicos têm mostrado a associação entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em compostos fenólicos e a prevenção de doenças. Ao suco de uva é atribuído um efeito hipolipidêmico, que pode envolver a regulação da expressão do receptor de LDL, inibição da síntese de lipídios hepáticos, secreção de

lipoproteínas e aumento da eliminação de colesterol via ácidos biliares (MALACRIDA e MOTTA, 2005; DÁVALOS *et al.*, 2006).

3.3 ESTATINA

As estatinas foram descobertas em 1973 por Endo e Kuroda, que estudavam metabólitos microbianos que, por competição, poderiam inibir a ação da enzima 3-hidroxil-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, a etapa limitante na síntese do colesterol. Ao examinar mais de 6000 cepas de microrganismo, o antibiótico Citrinina foi isolado do *Pythium ultimum*, e mais tarde, em 1976, a mevastatina, do *Penicillium citrinum* (LAWS *et al.*, 2004).

A mevastatina se assemelha ao precursor de colesterol HMG-CoA e em estudos realizados inibiu a biossíntese de colesterol, porém causou toxicidade hepática, e seu desenvolvimento foi interrompido. Em 1979, Hoffman e colaboradores isolaram do *Aspergillus terreus* metabólitos ativos de mevinolina e lovastatina (ALBERTS *et al.*, 1980; ALBERTS, 1990). A lovastatina não mostrou efeitos hepatotóxicos, sendo aprovada para uso em humanos (LIAO e LAUFS, 2005).

Desde sua introdução no final dos anos 80 no mercado de medicamentos, as estatinas, que apresentam estruturas homólogas à HMG-CoA redutase, têm revolucionado o tratamento da hipercolesterolemia e mostrado sua capacidade em reduzir a morbidade e mortalidade por doença coronariana tanto na prevenção primária quanto na prevenção secundária (KWAK *et al.*, 2003; MERX e WEBER, 2008).

Várias outras estatinas, naturais e modificadas quimicamente, foram desenvolvidas, entre elas, a pravastatina, sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina e rosuvastatina (MERX e WEBER, 2008). Na segunda geração de estatinas, são incluídas a sinvastatina e a pravastatina. E a nova geração sintética inclui a fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, pitavastatina e rosuvastatina (LIAO e LAUFS, 2005).

As estatinas são uma classe de medicamentos hipolipemiantes que variam consideravelmente nas suas características farmacológicas, lipofílicas, na vida média, metabolismo e em outras propriedades. A pravastatina circula no sangue ligada à proteína em 50%, ao passo que a atorvastatina, a sinvastatina e a fluvastatina circulam na corrente sanguínea ligadas à proteína em 95 a 98% (JORGE *et al.*, 2005).

As diferenças na permeabilidade tecidual e no metabolismo das estatinas podem influenciar em seus efeitos. Estatinas lipofílicas, como a sinvastatina, têm maior capacidade de penetrar nas células endoteliais por difusão passiva do que as estatinas hidrofílicas como a pravastatina e a rosuvastatina, cujo principal alvo é o fígado (LIAO e LAUFS, 2005).

Em estudo foi investigada a extensão da aterogênese em coelhos hipercolesterolêmicos tratados com doses de 15mg/dia de lovastatina, sinvastatina e pravastatina. Os animais tratados com lovastatina e sinvastatina tiveram menor concentração de colesterol tecidual do que os que receberam pravastatina (THIERY *et al.*, 1991).

A estrutura da porção catalítica da HMG-CoA redutase humana complexada com diferentes estatinas foi recentemente determinada (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001). Componentes hidrofóbicos da estatina ocupam os sítios de ligação da HMG e bloqueiam o acesso do substrato à HMG. A forte ligação das estatinas se dá em função de um grande número de interações *van der Waals* entre estatinas e HMG-CoA redutase. As diferenças são pequenas no modo de ligação das várias estatinas (LIAO e LAUFS, 2005).

As estatinas, por mecanismo de competição, inibem a atividade da HMG CoA redutase, reduzindo assim a L-mevalonato disponível e a biossíntese de colesterol (KWAK *et al.*, 2003). Com a diminuição da concentração deste colesterol hepático, é estimulado um mecanismo de compensação onde ocorre o aumento da expressão de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na superfície dos hepatócitos, resultando em aumento da remoção de LDL do sangue e sua redução plasmática (KWAK *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2005).

As estatinas desempenham o papel principal na diminuição do colesterol total e na melhora do perfil lipídico, mas, recentemente, têm sido demonstrados seus efeitos pleiotrópicos, que incluem melhora da

função endotelial, redução do estresse oxidativo, redução da adesão plaquetária e estabilização da placa de aterosclerose (JORGE *et al.*, 2005; LUDMAN *et al.*, 2009).

3.4 POLIFENÓIS

3.4.1 ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLIFENÓIS

Polifenóis são metabólitos de plantas derivados do L-fenilalanina, caracterizados pela presença de vários grupos fenóis e anéis aromáticos com hidroxilas. Os polifenóis se dividem em duas importantes classes: a classe dos flavonoides, da qual fazem parte o grupo dos flavonóis como quercetina e canferol, flavanóis como catequinas e proantocianidinas e as flavonas, isoflavonas, flavanonas e antocianinas; a classe dos não flavonoides, que inclui os ácidos fenólicos que apresentam uma estrutura simples com um único anel aromático, que compreende os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzoicos e as estruturas poliméricas como taninos, lignanas e estilbenos (MAMEDE e PASTORE, 2004; OVASKAINEN *et al.*, 2008; PETTI e SCULLY, 2009).

Os flavonoides apresentam estrutura química baseada no núcleo flavilium, que compreende 15 átomos de carbono que se distribuem em dois anéis de benzeno (anéis A e B) ligados por um grupo pirano (anel C), cuja representação da fórmula é $C_6-C_3-C_6$ (Figura 2) (MAMEDE e PASTORE, 2004; OVASKAINEN *et al.*, 2008). O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que pode ser um pirano heterocíclico, denominado de núcleo flavan. O terceiro anel, apresentado como uma pirona, pode variar sua substituição padrão, resultando em outras classes de flavonoides como flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

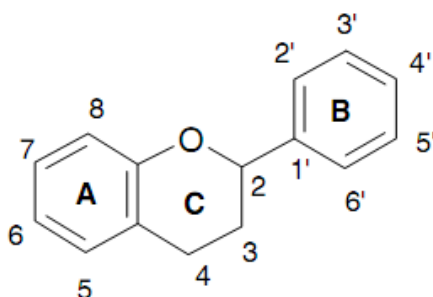
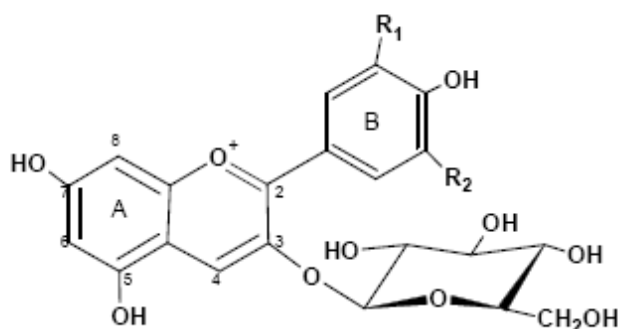


Figura 2: Estrutura geral da molécula do flavonoide.

Antocianinas são flavonoides que se apresentam em duas formas químicas: glicosídica e acilglicosídica de antocianidina. A antocianina (Figura 3) é constituída por duas ou três moléculas, uma aglicona, um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos. Os açúcares mais abundantes presentes nas antocianinas são glicose, raminose, xilose, galactose, arabinose e frutose. O açúcar é esterificado nos resíduos 3,5,7,3' e 5'. As formas glicosídicas são mais estáveis que a forma aglicona (TEDESCO *et al.*, 2001; MALACRIDA e MOTTA, 2006).



Aglicona (Estrutura do anel B)	Substituição glicosídica (substituição nas posições 3 e 5)	Acilação (esterificação das hidroxilas do açúcar)
R ₁ = R ₂ = H	Pelargonidina	Ácidos cinâmicos
R ₁ = OH, R ₂ = H	Cianidina	p-cumárico
R ₁ = R ₂ = OH	Delfinidina	Ferúlico
R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = H	Peonidina	Caféico
R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH	Petunidina	
R ₁ = R ₂ = OCH ₃	Malvidina	Ácidos alifáticos
	D-glicose	Acético
	D-galactose	Malônico
	D-xilose	Succínico
	L-ramnose	
	L-arabinose	
	Rutnose	
	Soforose	
	Sambubiose	
	Gentiobiose	

Figura 3: Estruturas químicas das antocianinas (Fonte: MALACRIDA e MOTTA, 2006)

Os estilbenos são um pequeno grupo de fenilpropanoides que possuem dois anéis aromáticos ligados por dois átomos de carbono que

contêm duplas ligações e apresentam a fórmula estrutural básica C₆-C₂-C₆ (Figura 4) (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; LEE e RENNAKER, 2007; RODEIRO *et al.*, 2008). A atividade antioxidante dos estilbenos é proporcionada pela presença da hidroxila na posição 4 do anel B, que é o maior grupo funcional, e pela a estrutura meta-hidroxila do anel A. Os estilbenos podem se apresentar na forma *cis* e *trans*, os isômeros *cis*-estilbenos são menos estáveis que os *trans* pelo impedimento estérico entre os anéis aromáticos, contudo, alguns estilbenos naturais ocorrem predominantemente na forma *cis*, como a combretastatina A (CHONG *et al.*, 2009).

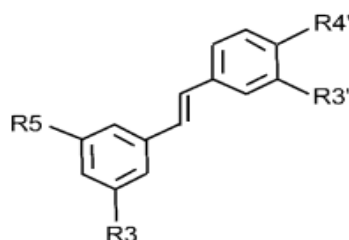


Figura 4: Estrutura básica dos estilbenos

Poucas espécies de plantas são capazes de produzir estilbenos, apesar de a maioria das plantas sintetizar as moléculas precursoras malonil-CoA e CoA-éster, derivadas do ácido cinâmico, entretanto, a biossíntese deste composto depende da enzima estilbeno sintase, que é produzida por um número limitado de espécies de plantas (CHONG *et al.*, 2009). A maioria dos estilbenos de plantas é derivada da unidade básica do *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-*trans*-stilbeno) (HALLS e YU, 2008; RODEIRO *et al.*, 2008; CHONG *et al.*, 2009).

3.4.2 FONTES DOS POLIFENÓIS

Os compostos fenólicos são vastamente distribuídos nas plantas e fazem parte da dieta humana. Podem ser consumidos através de frutas,

hortaliças e bebidas (OVASKAINEN *et al.*, 2008; PETTI e SCULLY, 2009). Nos alimentos, os fenólicos contribuem com o amargor, adstringência, cor, *flavor*, odor e estabilidade oxidativa nos alimentos (NACZK e SHAHIDI, 2006).

Os teores de fenólicos nas frutas e hortaliças dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos como gênero, espécie, cultivares agronômicos, ambiente, manuseio e estocagem. Em bebidas como sucos de frutas processados ou naturais, café, chá e vinhos, a concentração de polifenóis pode variar em função da maturação do fruto, técnicas de fabricação, parâmetros no processamento, entre outros (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

O consumo de frutas e vegetais contribui para um maior aporte de polifenóis na dieta. A Organização Mundial de Saúde recomenda uma ingestão mínima de 400g/dia de hortaliças e frutas. Em países como Espanha, Dinamarca, Japão e Estados Unidos, o consumo de polifenóis varia de 18 a 40 mg/dia. Em algumas frutas como banana, lichia, manga e caqui, são menores os teores de polifenóis do que em frutas vermelhas (mirtilos, morangos, framboesa, amora e *cranberries*) e uvas (WHO, 2003; FALLER e FIALHO, 2009).

Em estudo realizado no Brasil, foi analisado o teor de polifenóis de seis frutas e hortaliças mais consumidas no Brasil, utilizando os dados divulgados na Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). As frutas e hortaliças analisadas foram abacaxi, banana, laranja, mamão, manga, tangerina, batata, brócolos, cebola, cenoura, repolho e tomate. Para as frutas analisadas, o teor de polifenóis variou de 15,3 a 215,7mg EAG/100g de peso fresco, sendo aquelas com menor teor de polifenóis o mamão e a banana, respectivamente. Para as hortaliças, os valores médios variaram de 13,7 mg EAG/100g de peso fresco para tomate e de 113,2mg EAG/100g de peso fresco para cebola. Entretanto, a banana foi responsável por fornecer 33,6% dos polifenóis consumidos diariamente no Brasil, de acordo com os alimentos analisados (FALLER e FIALHO, 2009).

As uvas e seus produtos como suco de uva e vinho contêm uma grande diversidade de polifenóis, que incluem ácidos fenólicos,

flavonoides complexos, antocianinas e o resveratrol. A quantidade total de polifenóis é maior na casca do que na polpa da uva roxa, e as antocianinas são encontradas predominantemente na casca (ABE *et al.*, 2007; LEIFERT e ABEYWARDENA, 2008).

Entretanto, tabelas de composição com informações sobre a quantidade de polifenóis contida em cada alimento não estão disponíveis, pois existe uma grande variedade de polifenóis que podem ser alterados pela série de fatores relatados acima e, conseqüentemente, modificar a concentração nos alimentos (PETTI e SCULLY, 2009).

3.4.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS POLIFENÓIS

Desde o final do século XIX e início do século XX, os químicos têm estudado antioxidantes. Nesta época, antioxidante era um grupo de compostos caracterizados por sua habilidade de se oxidar no lugar de outros componentes. Eram usados tanto na conservação de alimentos quanto na vulcanização da borracha. Contudo, em 1960, pesquisadores destacaram sua importância na saúde humana (SEIFRIED *et al.*, 2007).

Nas plantas, os polifenóis desempenham importantes funções, proporcionando o desenvolvimento de flores, frutos e pigmentação de semente, atraindo polinizadores e dispersando sementes, promovendo a fertilização e germinação do pólen, agindo como sinalizador entre plantas e micróbios, protegendo contra luz ultravioleta e outras funções defensivas (PETTI e SCULLY, 2009). Contribuem também com a cor e características sensoriais de frutas e vegetais (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

Alguns polifenóis são estudados por serem um componente de defesa em algumas espécies de plantas, como o resveratrol. A irradiação UV e ataques de fungos induzem a biossíntese de resveratrol nas folhas, na casca e nas sementes de uvas (HALLS e YU, 2008).

Nos seres humanos, os polifenóis exercem ações fisiológicas importantes, sugerindo benefícios na saúde humana como atividade

antioxidante, anti-inflamatória e antimutagênicas e outras bioatividades (FERGUSON, 2001; OVASKAINEN *et al.*, 2008; FALLER e FIALHO, 2009).

Componentes fenólicos mostraram inibir a via das enzimas ciclo-oxigenase e a 5-lipoxigenase, que reduz a liberação do ácido araquidônico, ponto inicial para gerar a resposta inflamatória. As lipoxigenases também são encontradas nos neutrófilos, células que produzem componentes quimiotáticos e promovem a liberação de citocinas, que são mediadores da inflamação e da resposta imune. A quercitina, em particular, inibe atividade tanto da ciclooxigenase quanto da lipoxigenase (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Polifenóis podem influenciar diretamente na atividade do DNA. A expressão do gene da DNA-beta-polimerase foi induzida na forma de dose dependente pelo polifenol miricetina. A DNA-beta-polimerase faz parte de uma classe de enzimas que atua na reparação das fitas do DNA no momento da replicação, portanto, a indução desta enzima poderia melhorar a reparação do erro no DNA (FERGUSON, 2001).

3.4.4 METABOLISMO DOS POLIFENÓIS

O metabolismo dos polifenóis ocorre em uma via comum (Figura 5). As agliconas podem ser absorvidas no intestino delgado e são geralmente ausentes na corrente sanguínea, ou estão presente em baixas concentrações depois do consumo. Contudo, muitos polifenóis estão presentes nos alimentos na forma de éster, glicosídeos ou polímeros, que não podem ser absorvidos na sua forma nativa e, portanto, devem ser hidrolisadas pelas enzimas intestinais ou pela microbiota colônica antes de serem absorvidas. Quando a microbiota colônica está envolvida, a eficiência da absorção é geralmente diminuída porque a microbiota também degrada a aglicona, que é liberada e produz vários ácidos aromáticos simples no processo (MANACH *et al.*, 2004).

No processo de absorção, os polifenóis são conjugados no intestino delgado e depois no fígado, incluindo o processo de metilação, sulfatação e glicoronidação. Estes derivados conjugados quando chegam à corrente sanguínea são transportados pela albumina até os tecidos, provavelmente onde serão metabolizados (MANACH *et al.*, 2004).

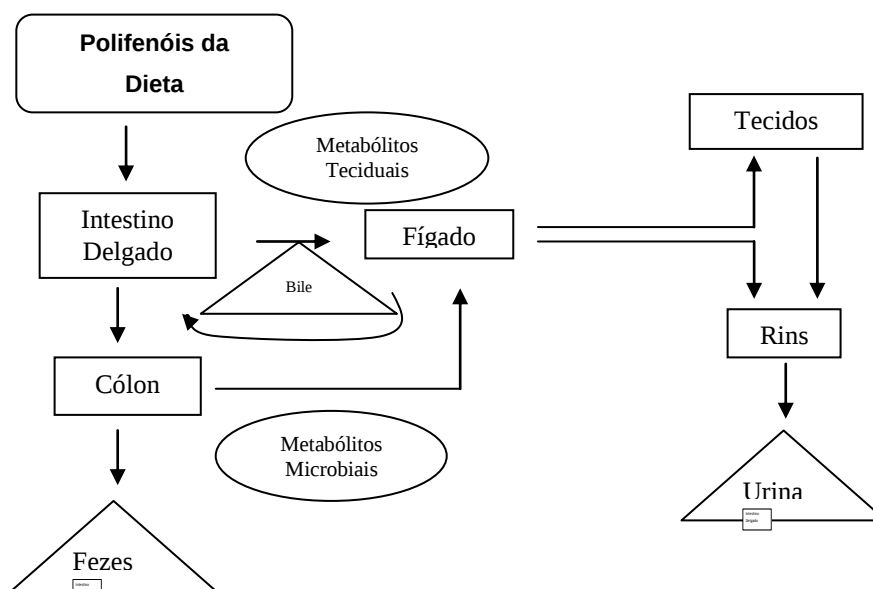


Figura 5: Rota metabólica dos polifenóis da dieta em humanos (Adaptado de Scalbert *et al.* (2002)).

3.4.4.1 ABSORÇÃO

Uma vez ingeridos, os polifenóis podem ter vários destinos possíveis, podendo a absorção ser realizada no intestino delgado ou no cólon e serem excretados nas fezes ou urina. O sítio e a taxa de absorção dependem da estrutura química, grau de glicosilação/acilação, conjugação de outros fenólicos, tamanho da molécula, grau de polimerização e solubilidade (ZERN e FERNANDEZ, 2005).

A estrutura química do polifenol tem o maior impacto na absorção intestinal. Os parâmetros estruturais mais estudados são a massa

molecular, glicosilação e esterificação. Por exemplo, o alto peso molecular da proantocianidina e sua estrutura com vários graus de polimerização explicam sua baixa absorção (SCALBERT *et al.*, 2002).

No intestino delgado, os polifenóis, que são hidrofílicos, podem ser absorvidos por difusão passiva no intestino, enquanto, por exemplo, os ácidos cinâmico e ferúlico são absorvidos no jejuno por sistema ativo dependente de Na^+ . No cólon, os polifenóis são inicialmente digeridos em pequenos fenólicos pela microbiota intestinal. Depois da digestão completa, os polifenóis e seus metabólitos podem ser absorvidos e transportados no plasma. Para a maioria dos polifenóis, o pico de concentração máxima no plasma é observado entre 1 a 2 horas após a ingestão (ZERN e FERNANDEZ, 2005).

Os polifenóis, ao serem absorvidos, são transportados para o fígado e depois para os tecidos extra-hepáticos e para os rins, onde serão excretados. Podem, também, ser incorporados à bile e retornar ao intestino delgado e, eventualmente, ser excretados nas fezes (ZERN e FERNANDEZ, 2005).

3.4.4.2 DEGRADAÇÃO DOS POLIFENÓIS PELA MICROBIOTA INTESTINAL

Os polifenóis da dieta, que não foram absorvidos, e os metabólitos excretados na bile, que entram no cólon, podem seguir duas rotas: os polifenóis intactos podem ser absorvidos pelo epitélio colônico e passar para a corrente sanguínea na forma intacta ou conjugada; ou sofrer transformações estruturais, sendo desconjugados pelas hidrolases da microbiota intestinal, que podem reduzi-los a metabólitos, promovendo a cisão nos anéis aromáticos das estruturas para, então, ocorrer a absorção (YANG *et al.*, 2001; WILLIAMSON e MANACH, 2005).

O metabolismo microbial merece atenção especial porque muitos dos vários polifenóis são quebrados em componentes fenólicos simples, comuns a diferentes polifenóis. Por exemplo, a daidzeína é convertida a

equol pela microbiota intestinal em 30% a 40% da população humana, sendo absorvida. Existe evidência de que o equol produzido mostra efeitos na densidade mineral óssea depois do consumo de isoflavonas (WILLIAMSON e MANACH, 2005; MANACH *et al.*, 2005). As lignanas são, por sua vez, convertidas para enterodiol e enterolactonas no cólon e passam para a circulação entero-hepática, onde podem ser absorvidas, transportadas para o fígado e excretadas na bile (YANG *et al.*, 2001).

3.4.4.3 BIOTRANSFORMAÇÃO

A biotransformação é um processo em que as células modificam xenobióticos, cujo objetivo final é facilitar sua eliminação. Componentes lipofílicos que poderiam se acumular nos lipídios intracelulares são transformados em estruturas mais hidrofílicas, em que enzimas específicas são capazes de introduzir novos grupos funcionais (Fase I da reação), ou fazem a conjugação com moléculas hidrofílicas endógenas para aumentar a solubilidade na água (Fase II da reação) (RODEIRO *et al.*, 2008).

Os polifenóis são prontamente conjugados pela glicoronidação, sulfatação e metilação no intestino delgado, fígado e outros órgãos. A glicuronidação é catalisada pela UDP-glicuroniltransferase, a sulfatação, pelas sulfotransferases citoplasmáticas, e a catecol-O-metiltransferase catalisa a transferência do grupo metil para os polifenóis (YANG *et al.*, 2001). Este processo de biotransformação metabólica é comum a muitos xenobióticos que têm seu potencial efeito tóxico reduzido e facilitam sua eliminação através da bile e urina pelo aumento da hidrofiliabilidade (MANACH *et al.*, 2004).

A conjugação da quercetina ocorre na mucosa intestinal e depois é secretada para o lúmen ou serosa intestinal e transportada para o fígado onde será mais uma vez metabolizada. A catequina é extensivamente metilada no fígado. Em estudo em que foram perfundidas as catequinas no intestino de ratos, observou-se que metade da catequina circulante no

plasma da veia mesentérica foi a O-metilada, enquanto 99% da catequina excretada na bile foi também a O-metilada (SCALBERT *et al.*, 2002).

3.4.4.4 BIODISPONIBILIDADE

A biodisponibilidade dos polifenóis é importante para o entendimento de suas atividades biológicas. A biodisponibilidade varia muito entre os diferentes polifenóis. Alguns fatores influenciam a biodisponibilidade, entre eles, destacam-se as propriedades químicas dos polifenóis, deconjugação/reconjugação no intestino, absorção intestinal e a disponibilidade de enzimas no organismo (YANG *et al.*, 2001).

A biodisponibilidade dos polifenóis foi comparativamente revisada. O ácido gálico é o mais bem absorvido em relação aos outros polifenóis, enquanto as proantocianidinas e antocianidinas são pouco absorvidas. Em humanos, os polifenóis mais bem absorvidos são as isoflavonas e o ácido gálico, seguidos pelas catequinas, flavononas e glicosídeos de quercetina (RODEIRO *et al.*, 2008).

O efeito do alimento na biodisponibilidade dos polifenóis tem sido muito estudado. A interação entre polifenóis e alguns componentes dos alimentos pode afetar a sua absorção, entre os quais, podemos destacar proteínas, polissacarídeos e álcool. Somados ao efeito da matriz alimentar, a fisiologia intestinal como pH, fermentação intestinal, excreção biliar, tempo de trânsito intestinal, entre outros, podem também alterar a biodisponibilidade dos polifenóis (MANACH *et al.*, 2004). Entretanto, dados existentes não sugerem um efeito marcante do efeito dos componentes da dieta na biodisponibilidade dos polifenóis. A absorção de quercetina, catequina e resveratrol em humanos foi equivalente quando estes polifenóis foram administrados em três diferentes matrizes alimentares: vinho branco, suco de uva e suco vegetal (MANACH *et al.*, 2004).

A administração de polifenóis sem uma matriz alimentar poderia afetar a sua biodisponibilidade. Em estudo em que foi administrada a voluntários em jejum uma solução de quercetina, foi observada uma alta

concentração plasmática ($5\mu\text{mol/L}$) deste polifenol (OLTHOF *et al.*, 2000). Em outro estudo em que um grupo de voluntários recebeu quantidade equivalente de quercetina em cebola, maçã ou numa refeição complexa, foi verificada uma concentração plasmática menor ($0,3\text{-}0,75\text{ nmol/L}$), sugerindo que componentes alimentares podem limitar a absorção de polifenóis (MANACH *et al.*, 2004).

Acreditava-se que somente as antocianidinas, agliconas de antocianina, por apresentarem uma estrutura livre de resíduo de açúcar, eram absorvidas pelas células intestinais e transportadas na corrente sanguínea. Atualmente, numerosos estudos mostram a absorção *in vivo* de flavonoides glicosídeos, particularmente a cianidina-3-glicosídeo (C3G) e outras cianidinas glicosídeos (GALVANO *et al.*, 2004).

Müller *et al.* (2001) compararam a excreção urinária de antocianina após a ingestão simultânea de *elderberry* com e sem açúcar. O total de antocianina excretada após a ingestão de *elderberry* com açúcar foi menor que sem açúcar, indicando que os carreadores de açúcar podem desempenhar um papel na absorção de flavonoides.

Vários estudos em animais e humanos mostraram uma baixa absorção intestinal de resveratrol identificada por quantidades traço na corrente sanguínea. A pequena meia vida do metabólito primário, aproximadamente 8 a 14 minutos, explica o metabolismo rápido. Dose intravenosa de resveratrol em concentrações aumentadas é convertida a sulfatos conjugados dentro de 30 minutos em humanos. (SAIKO *et al.*, 2008).

Estudo farmacocinético com voluntários saudáveis mostrou que somente a ingestão de altas doses de resveratrol, 5 g, levou a picos na concentração plasmática de $2,4\mu\text{mol/L}$ depois de 1,5 horas após ser ingerido. Porém, a excreção urinária foi rápida, pois 77% de todo o resveratrol e seus metabólitos foram excretados dentro de 4 horas (LEIFERT e ABEYWARDENA, 2008).

3.4.5 POLIFENÓIS E SAÚDE HUMANA

Os polifenóis apresentam uma forte atividade antioxidante *in vitro* e são capazes de bloquear ações de reativos de oxigênio, nitrogênio e cloro, como ânion superóxido, radical hidroxil e peroxil, ácido hipocloroso e ácido peroxinitroso. Também quelam com íons metais, diminuindo sua atividade pró-oxidante (PETTI e SCULLY, 2009). Sua propriedade biológica está relacionada à atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio (MAMEDE e PASTORE, 2007).

Existem várias evidências de que o risco oxidativo está associado ao desenvolvimento de doenças degenerativas e tem sido muito especulado que os polifenóis podem desempenhar um efeito contra estas condições. Altas ingestões de polifenóis têm sido relacionadas à diminuição do risco de vários tipos de câncer, desordens neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (PETTI e SCULLY, 2009).

Estudos epidemiológicos sugerem com evidências que a ingestão de flavonoides reduz a mortalidade por doença arterial coronariana em mais de 65% e o risco de infarto, assim como cânceres no pulmão e reto, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica. Estudos *in vitro* e em animais têm mostrado diminuição na imobilização de leucócitos, indução de apoptoses, proliferação celular e inibição da angiogênese. No entanto, o efeito no cólon, epitélio, ovário, cânceres testiculares e estomacais, trato urinário, próstata e mama não está claro (PETTI e SCULLY, 2009).

Polifenóis têm mostrado proteger o organismo humano de doenças coronarianas. Alguns mecanismos são discutidos, entre eles, a redução da absorção de colesterol, resultando na diminuição da entrada de colesterol no fígado, e a regulação dos receptores de LDL (ZERN e FERNANDEZ, 2005).

Os polifenóis também exercem importante papel na inibição da oxidação da LDL. A oxidação da LDL está correlacionada com a aterosclerose e suas complicações como a doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular cerebral e/ou doença vascular periférica. Ao ser oxidada, a LDL perde sua capacidade de transportar colesterol que se

deposita no interior da artéria, levando à formação da placa de ateroma (MAMEDE e PASTORE, 2004).

3.5 RESVERATROL

A estrutura dos estilbenos foi descrita pela primeira vez em 1829. A investigação sobre suas propriedades começou pela sua atividade antibiótica contra bactérias e fungos (CHRZAŚCIK, 2009). O resveratrol foi isolado em 1940, como um ingrediente de raízes de uma planta medicinal com efeito analgésico (*Veratrum grandiflorum* O. Loes). Em 1963, foi identificado como um constituinte ativo de raíz seca de *Polygonum cuspidatum*, também conhecida como Ko-jo-kon em japonês, e usada na tradicional medicina asiática contra dermatites, gonorréias e hiperlipidemia. Em videiras foi identificado em 1976 e então em 1992 em vinhos (SAIKO *et al.*, 2008).

Resveratrol é um polifenol sintetizado naturalmente por aproximadamente 72 plantas como eucalipto, amendoim, amora e uvas. É encontrado nas formas isômeras *trans*-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Figura 6) e também na forma glicosídica, denominado *piceid* (DONG, 2003; NIKFARDJAM *et al.*, 2006; SAUTTER *et al.*, 2005; QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2007; CHRZAŚCIK, 2009).

O que difere o resveratrol do *piceid* é o grupo glicosídeo no lugar de uma hidroxila. O resveratrol tem uma porção fenol por causa de uma hidroxila na posição 4' e uma molécula de m-hidroquinona por causa de grupos hidroxilas nas posições 3 e 5. Tem sido demonstrado que a 4'-hidroxi é o mais reativo na eliminação de radicais livres, porque o radical fenoxil correspondente pode deslocar o elétron desemparelhado na molécula. A substituição de uma hidroxila por um grupo glicosil faz o radical mais estável e impede a reação com outra molécula de *piceid* (FABRIS *et al.*, 2008).

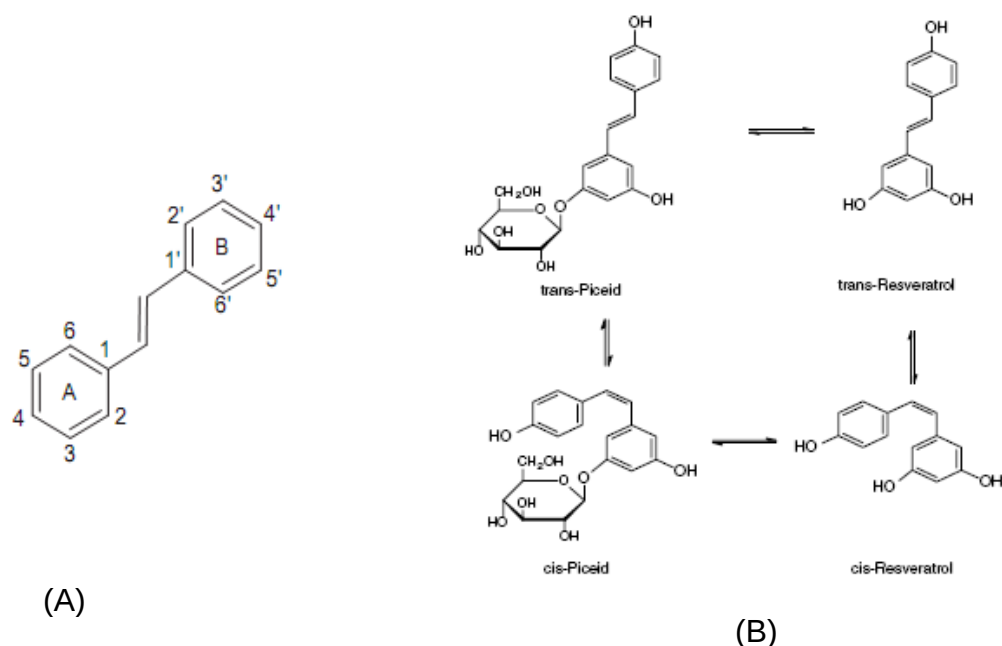


Figura 6: Estrutura geral dos estilbenos (A) e resveratrol e seus derivados (B) (Nikfardjam *et al.*, 2005; Fraga *et al.*, 2010).

Os isômeros *cis*-resveratrol são mais encontrados no vinho, nos talos das videiras e no suco de uva. Na uva, ele é sintetizado na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticula*), dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta. O isômero *trans*-resveratrol é convertido para *cis*-resveratrol em presença de luz visível (NIKFARDJAM *et al.*, 2006; SAUTTER *et al.*, 2005; KASDALLAH-GRISSA *et al.*, 2007).

Os efeitos benéficos do resveratrol estão associados à prevenção do câncer e doenças cardiovasculares, potente fator anti-inflamatório e ação antioxidante que contribui na redução dos riscos de peroxidação lipídica na membrana celular e danos ao DNA (KALS *et al.*, 2006; KASDALLAH-GRISSA *et al.*, 2007). A ação antioxidante do resveratrol é devida à sua estrutura capaz de doar um elétron da molécula de hidrogênio do grupo hidroxil (LÜPEZ-VELEZ *et al.*, 2003).

Vários estudos têm associado a baixa incidência de doenças coronárias ao consumo moderado de vinho tinto na população francesa, uma população que geralmente consome uma dieta rica em gordura. O resveratrol, particularmente abundante no vinho tinto, mostra efeitos

benéficos nas doenças cardiovasculares, e sua ação nessas doenças é provavelmente interferindo em vários processos moleculares (BORRIELLO *et al.*, 2010).

A proteção do resveratrol contra as doenças cardiovasculares foi bem associada a inúmeros efeitos, que incluem: diminuição da peroxidação lipídica, melhora no perfil sérico de colesterol, redução na agregação plaquetária, vasodilatação e diminuição da pressão sanguínea, ação antiaterosclerótica, proteção das células endoteliais contra apoptose, indução na neogênese do infarto do miocárdio e diminuição da proliferação celular do músculo liso (BORRIELLO *et al.*, 2010).

A prevenção da atividade anti-inflamatória é uma das ações mais importantes do resveratrol para evitar doenças cardiovasculares, pois inibe a oxidação das LDLs através da inibição da atividade lipoxigenase, aumenta HDL, previne a agregação plaquetária e regula a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais (NIKFARDJAM *et al.*, 2006; GÜLÇİN, 2010).

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio representam um paradoxo na sua função biológica: por um lado, previnem doenças por destruir microrganismos durante o processo de fagocitose, mecanismo fundamental para o sistema imune na defesa contra infecções. Podem influenciar na atividade celular intrínseca como nos processos de proliferação, diferenciação, migração e morte celular, dependendo da quantidade de radicais, duração da exposição celular ao radical livre e do tipo celular que sofreu ação do radical livre. Por outro lado, podem apresentar perigos a importantes macromoléculas nas células e desencadear processos no desenvolvimento de doenças como câncer e doenças cardiovasculares (LEITE e SARNI, 2003; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; SEIFRIED *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*,

2010). A geração de radicais livres faz parte do processo fisiológico normal, aproximadamente, de 1% a 3% do oxigênio consumido pelo corpo é convertido a radical livre. Podem ser produzidos por vários eventos celulares, entre os quais se destacam os processos inflamatórios, catabolismo de ácidos graxos, degradação da xantina a ácido úrico e auto-oxidação de catecolaminas (SEIFRIED *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2010).

Para manter a homeostase, o organismo promove um balanço entre oxidantes e antioxidantes através de reações de redução e oxidação, que envolvem a transferência de elétrons entre duas espécies químicas: um componente que perde elétrons (oxida) e outro que ganha elétrons (reduz) (SEIFRIED *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2010).

Os radicais livres são moléculas e átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada externa. Muitos radicais livres são instáveis e altamente reativos e são formados nos processos que envolvem o oxigênio. Os radicais livres originados do oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROS), enquanto os que se originam da reação do oxigênio com nitrogênio são considerados uma subclasse de radicais livres e chamadas espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (PENNA *et al.*, 2009).

Os radicais livres de oxigênio incluem o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($OH^\bullet$). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas é frequentemente discutido como espécie reativa de oxigênio porque é muito reativo e pode ser formado pelo ânion superóxido e gerar radicais hidroxilas. Outras espécies não radicais são: oxigênio *singlete* (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3), entre outros. Das espécies reativas de nitrogênio, fazem parte o óxido nítrico ($NO^\bullet$), o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é formado da reação do O_2^- com $NO^\bullet$, dióxido de nitrogênio ($NO_2^\bullet$) e o nitrosil hidreto (HNO) (THOMAS, 2003; STINTZING e CARLE, 2004; PENNA *et al.*, 2009).

O sistema biológico possui várias defesas contra os radicais livres, mecanismos podem ser enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático é representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx), que representam a

primeira linha de defesa antioxidante. O não enzimático é formado por muitas substâncias, entre elas estão os componentes de baixo peso molecular que reagem com os oxidantes químicos glutathione, ubiquinol e ácido úrico. Os minerais como selênio, cobre, manganês, zinco estão envolvidos na estrutura catalítica das enzimas oxidantes, bem como as vitaminas E, C e carotenoides, principalmente. E ainda, as proteínas de transporte de metais de transição, que incluem a transferrina, ceruplasmina e albumina, podem sequestrar íons de ferro e cobre e prevenir suas participações em reações que produzem o radical hidroxila (THOMAS, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007^a).

Em relação à sua função, a defesa antioxidante pode ser classificada como antioxidantes de prevenção, antioxidante removedor e antioxidante reparador. Os antioxidantes de prevenção são a primeira linha de defesa, pois impedem a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por exemplo, reduzem o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídio, a água e hidróxidos de lipídio, respectivamente, e inibem as reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes removedores são a segunda linha de defesa, removem os radicais livres rapidamente antes que ataquem moléculas biologicamente essenciais, entre eles, podemos destacar a SOD, que converte o O_2^- a H_2O_2 , os carotenoides, que removem o oxigênio *singlet*, e muitos polifenóis, que também têm essa ação. Os oxidantes reparadores agem restaurando as estruturas celulares e reconstituindo a função perdida, sendo esta a terceira linha de defesa (NIKI, 2010).

A quarta linha de defesa está sendo considerada a adaptação aos mecanismos de função, em que os antioxidantes apropriados são gerados no tempo certo e transferidos para a posição certa na concentração necessária. É cada vez mais evidente que alguns antioxidantes agem como mensageiros na sinalização celular para regular o nível de componentes antioxidantes e enzimáticos (NIKI, 2010).

O desequilíbrio entre a produção e a inativação de radicais livres, seja pela queda na capacidade do sistema enzimático ou pelo excesso de produção de espécies de radicais livres, caracteriza o processo de estresse oxidativo (Figura 7). Como consequência, biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, carboidratos e DNA poderão ser alvo

de ataque dos radicais livres, levando à desestruturação de enzimas, membranas celulares e material genético, causando doenças. É atribuído aos radicais livres o desenvolvimento de mais de cem doenças (TEDESCO *et al.*, 2001; MAMEDE e PASTORE, 2004; STINTZING e CARLE, 2004; GÜLÇIN, 2010).

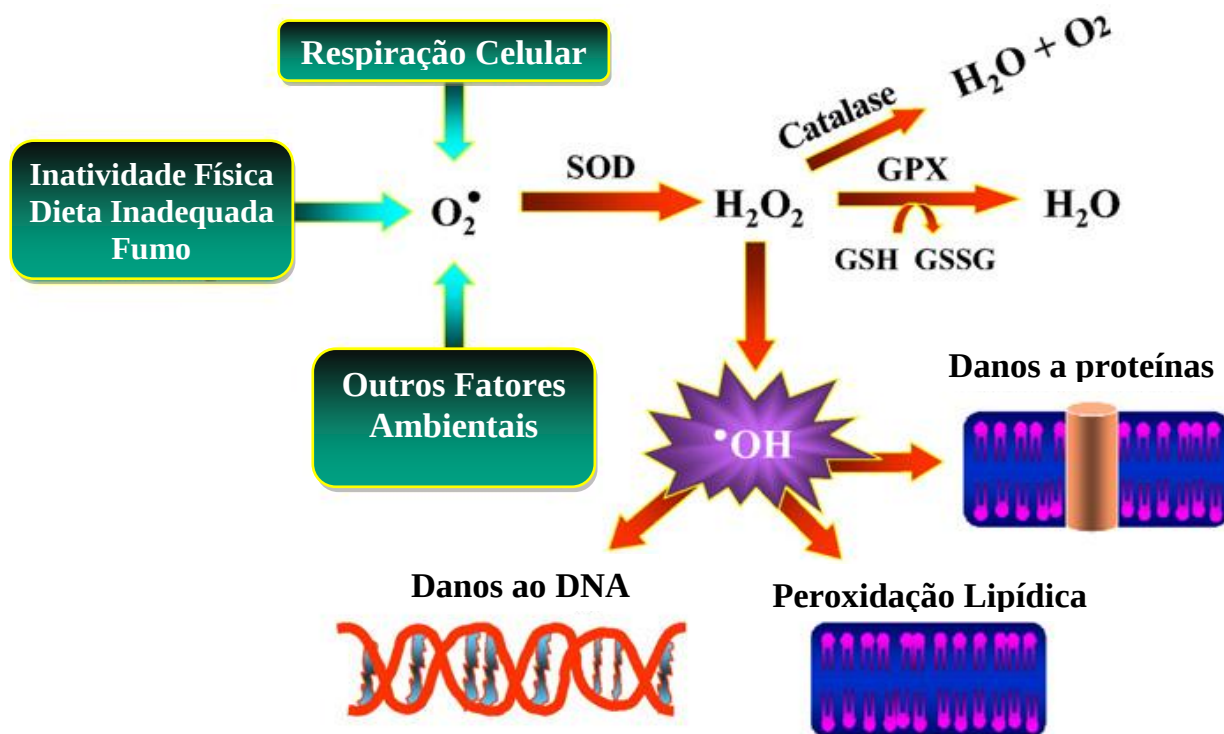


Figura 7: Mecanismo do Estresse Oxidativo (adaptado de Roberts e Sindhu 2009).

3.6.1 ESTRESSE OXIDATIVO NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS

Altas concentrações de radicais livres contribuem para a patogênese de várias doenças, especialmente quando os mecanismos de defesa do organismo estão debilitados, contribuindo para a iniciação, manifestação e complicações de doenças específicas (PENNA *et al.*, 2009). O estresse oxidativo pode estar relacionado a condições importantes como a síndrome metabólica e a doenças de alta incidência

na população como diabetes, câncer, doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson, doenças cardiovasculares, entre outras (KADENBACH *et al.*, 2009).

A doença cardiovascular pode ser classificada em doença coronariana, doença cerebrovascular e doença vascular periférica, em que o fornecimento de sangue para o coração, para o cérebro e para a vascularização periférica está comprometido. Comum a todas estas classificações é a formação de uma placa aterosclerótica ou lesão (um ateroma), que pode ocluir pequenos vasos sanguíneos e interromper o fluxo de sangue. Isto leva a manifestações agudas, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em que o abastecimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos é severamente comprometidos. Uma complicação da aterosclerose é a ruptura das placas, dando origem a um trombo que tem a habilidade de ocluir vasos a uma grande distância da placa original (FEARON e FAUX, 2009).

O desenvolvimento da doença cardiovascular tem suas principais causas relacionadas ao estresse oxidativo, à inflamação vascular e à disfunção endotelial (LEIFERT e ABEYWARDENA, 2008). As maiores fontes de estresse oxidativo no sistema cardiovascular são as enzimas NADPH oxidase, xantina oxiredutase, óxido nítrico sintase e o citocromo mitocondrial (PENNA *et al.*, 2009).

As NADPH oxidases vasculares são isoformas da enzima NADPH oxidase e estão presentes nas células endoteliais, fibroblastos e células da musculatura lisa vascular, que catalisam a redução de O_2 , usando NADH ou NADPH como doador de elétrons, gerando $O_2^{\bullet -}$. O sistema NADH/NADPH oxidase é a maior fonte de $O_2^{\bullet -}$ nas membranas endoteliais e musculaturas lisas (PORTALUPPI *et al.*, 2004; PARAVICINI e TOUYZ, 2006). Um aumento de $O_2^{\bullet -}$ gerado pela NADPH oxidase no vaso tem sido considerado um fator de risco clínico para a arteriosclerose e compromete a função do óxido nítrico no endotélio em pacientes com doença cardíaca coronária (FEARON e FAUX, 2009).

A enzima xantina oxirredutase é uma enzima presente no endotélio vascular, H_2O_2 e ácido úrico e, sob condições inflamatórias, a liberação de citocinas aumenta a atividade desta enzima, o que implica a produção de grandes quantidades de EROS. Este $O_2^{\bullet -}$ produzido pela xantina

oxiredutase é gerado no espaço extracelular e pode diminuir a biodisponibilidade de $\text{NO}^\bullet$ (VASCONCELOS *et al.*, 2007^b).

A enzima óxido nítrico sintase requer tetra-hidrobiopterina (BH_4) ligada próximo ao seu grupo heme para transferir elétrons a *L*-arginina e formar citrulina e $\text{NO}^\bullet$. Em certas condições, por exemplo, quando ocorre reduzida disponibilidade do co-fator BH_4 ou do substrato *L*-arginina, a óxido nítrico sintase endotelial pode produzir $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , esse fenômeno tem sido referido como desacoplamento da óxido nítrico sintase. O radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ reage com o NO , gerando espécies oxidantes secundárias como o peroxinitrito (ONOO^-), este sendo capaz de formar radical hidroxila ($^\bullet\text{OH}$) e oxidar moléculas de LDL, causando disfunção vascular (BAHIA *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2007^b; VÁSQUEZ-VIVAR, 2009; FEARON e FAUX, 2009)

A produção mitocondrial de EROS pode ser modulada pelo óxido nítrico e este pode ser convertido a várias ERNS como o ânion nitroxil (NO^-) ou o peroxinitrito (ONOO^-). Baixa concentração de óxido nítrico na artéria pode modular a respiração mitocondrial e o consumo de oxigênio através do ligante reversível para o citocromo c oxidase, aumentando a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , enquanto em níveis elevados o óxido nítrico reage com $\text{O}_2^{\bullet-}$, resultando na formação de ONOO^- (BALLINGER, 2005; PARADIES *et al.*, 2010). A reatividade do ONOO^- é considerada equivalente à reatividade da $\text{OH}^\bullet$, possuindo efeito citotóxico e contribuindo para disfunção endotelial (CARVALHO *et al.*, 2001; PENNA *et al.*, 2009).

3.7 COLESTEROL

O colesterol é um constituinte vital das membranas celulares e um precursor dos hormônios esteroides, tais como corticoides, hormônios sexuais, além da vitamina D e dos ácidos biliares que ajudam na digestão dos lipídios (LEHNINGER *et al.*, 1995; JONES, 1997). É um produto típico

do metabolismo animal e, portanto, ocorre em alimentos de origem animal como gema de ovo, carne, fígado e cérebro (MAYES, 1994).

O colesterol plasmático é proveniente de duas vias: a exógena, através da alimentação, e a endógena, através da síntese de acetil-CoA. Metade do colesterol do organismo surge por síntese, aproximadamente 500mg/dia, sendo dois terços dele sintetizado no fígado; o intestino é responsável por 15%; e a pele, por uma grande parte do restante (MAYES, 1994; ARAÚJO *et al.*, 2005).

O colesterol é construído com moléculas de acetil-CoA, e o processo ocorre em quatro estágios. No primeiro estágio, as três unidades de acetato se condensam para formar um intermediário com seis carbonos, o mevalonato. O estágio dois envolve a conversão do mevalonato em unidades de isopreno ativado, e o estágio três consiste na polimerização das seis unidades com cinco átomos de carbono do isopreno para formar a estrutura linear do esqualeno, com 30 átomos de carbono. No estágio quatro, há a formação do colesterol através de uma série de reações de oxidação, remoção ou migração de grupos metila (LEHNINGER *et al.*, 1995).

No primeiro estágio, que leva ao intermediário mevalonato, ocorre uma reação limitante mediada pela enzima HMG-CoA redutase, que reduz o HMG-CoA em mevalonato. A HMG-CoA redutase, uma proteína integral do retículo endoplasmático liso, é o principal ponto de regulação do colesterol. É regulada por hormônios como glucagon e insulina, e é inibida alostericamente por derivados do colesterol e do intermediário chave do colesterol mevalonato (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Em adição a esta inibição imediata pela HMG-CoA redutase, concentrações altas de colesterol intracelular também diminuem a síntese de HMG-CoA redutase e, conseqüentemente, de colesterol e ativam a ACAT, que reesterifica o colesterol para armazená-lo como gotículas de ésteres de colesteril (LEHNINGER *et al.*, 1995; VOET *et al.*, 2000).

O colesterol e os ésteres de colesterol, como os triacilgliceróis e fosfolípidios, são insolúveis em água. Portanto, não existem livres no plasma e, para serem transportados no meio aquoso, necessitam de estruturas organizadas, denominadas de lipoproteínas, que são as

unidades funcionais de transporte de lipídios na circulação sanguínea (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

3.7.1 LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas têm a função de suprir os tecidos com lipídios provenientes da dieta ou sintetizados pelo próprio organismo e servem como substrato para as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Diferem quanto ao local de síntese, composição lipídica, tamanho e conteúdo de apolipoproteínas. Contudo, a densidade, determinada pela relação entre proteína e gordura, é a propriedade física na qual se baseia a classificação atual (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; KRUMMEL, 2002; SCHIAVO *et al.*, 2003; FORTI e DIAMENT, 2006).

Componentes proteicos conhecidos como apolipoproteínas são específicos para a classe das lipoproteínas, contribuindo para a regulação do metabolismo das lipoproteínas como modulando a atividade de enzimas, dirigindo as lipoproteínas para tecidos específicos e interagindo com receptores celulares de alta afinidade. Um número de nove apolipoproteínas diferentes é encontrado entre as lipoproteínas do plasma humano (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; KRUMMEL, 2002).

As lipoproteínas são agregados esféricos, com os lipídios hidrofóbicos no centro, e as cadeias laterais hidrofílicas dos aminoácidos das proteínas na superfície se dividem em cinco classes de lipoproteínas plasmáticas: quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (KRUMMEL, 2002; SCHIAVO *et al.*, 2003; FORTI e DIAMENT, 2006).

3.7.1.1 QUILOMÍCRONS

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte de colesterol e gorduras dietéticas do intestino delgado para os tecidos periféricos. São formados no intestino a partir das gorduras da dieta e se movem através do sistema linfático, entrando na circulação sistêmica pela artéria subclávia (ALVES *et al.*, 2004).

Os quilomícrons são as maiores lipoproteínas e as menos densas, contêm cerca de 84% de triglicerídeos, 5% de colesterol esterificado, 2% de colesterol livre, 7% de fosfolípido e 2% de apolipoproteínas. As apolipoproteínas dos quilomícrons incluem a apoB-48 (única nesta classe de lipoproteínas), apoA-I, apoA-IV. Após entrar na circulação sanguínea, os quilomícrons recebem das HDL as apos C-II, C-III e E. Em troca, as HDL ganham fosfolípidos, colesterol não-esterificado, e as apolipoproteínas ganham A-I e A-IV (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; LEHNINGER *et al.*, 1995; SANTOS FILHO e MARANHÃO, 1999; ALVES *et al.*, 2004).

Em contato com a parede do endotélio capilar, a apo C-II dos quilomícrons ativa a lipase-lipoprotéica, que promove a hidrólise dos triglicerídeos contidos no núcleo hidrofóbico dos quilomícrons, liberando monoglicerídeos e ácidos graxos livres. Estes últimos se ligam à albumina plasmática para serem distribuídos para os tecidos adiposo, hepático e muscular (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; ALVES *et al.*, 2004).

As partículas que perdem triglicerídeos por ação da lipase-lipoprotéica são denominados remanescentes de quilomícrons, que possuem colesterol esterificado apo-E e apo-B48, que se movem até o fígado, onde serão captados e reciclados (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; LEHNINGER *et al.*, 1995; SANTOS FILHO e MARANHÃO, 1999).

3.7.1.2 VLDL

As VLDL são formadas nos hepatócitos e sua composição é cerca de 50% a 65% de triglicerídeo e de 15% a 25% de colesterol. A porção proteica inicial é formada pelas apolipoproteínas apo-B100, apo-AI e apo-AIV. No plasma sanguíneo, as apolipoproteínas A, C e E provenientes da HDL são transferidas para as VLDL (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; SANTOS FILHO e MARANHÃO, 1999).

As VLDL transferem triglicerídeos do fígado para outros tecidos, onde o lipídio pode ser armazenado e oxidado para produzir energia. A hidrólise dos triglicerídeos da VLDL ocorre por ação da enzima lipase-lipoproteica. Após a depleção dos triglicerídeos, a partícula de VLDL é convertida a IDL (JONES e KUBOW, 2003; WAITZBERG e BORGES, 2004).

A IDL, também chamada de remanescente de VLDL, é uma partícula mais densa, menor, rica em colesterol e ésteres de colesterol. Contém a apoB-100 como sua principal apolipoproteína, que permite o reconhecimento da IDL pelo receptor de LDL no fígado. Pela ação da enzima lipase lipoproteica hepática, esta partícula perde mais triglicerídeo e fosfolipídio, transformando-se em LDL. A IDL também pode ser metabolizada no plasma a LDL (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; WAITZBERG e BORGES, 2004).

3.7.1.3 LDLs

As LDL contém maior quantidade de colesterol, cerca de 75% na forma de ésteres, que é transportado aos tecidos periféricos, podendo depositar o excedente de colesterol nas artérias. A apo-B100 corresponde a 98% da apoproteínas na LDL. As LDLs são removidas pelo fígado através dos receptores B/E. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da HMG-CoA

redutase (IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2007).

3.7.1.4 HDL

As HDL formam-se no plasma e no compartimento extravascular. São constituídas por 50% de apoproteínas do tipo AI (em maior quantidade), AII, CI, CII, CIII, E e J, por 20% de colesterol livre (CL) e de colesterol esterificado (CE), por 15% de fosfolipídios e por 5% de triglicerídeos (TG) (FORTI e DIAMENT, 2006).

As HDL são responsáveis pelo transporte reverso de colesterol, transportando o excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos de volta para o fígado. Após sua formação, são captadas pelo fígado pelos receptores SRB1(*scavenger receptors B, class 1*) e pelos receptores apo E (também existentes na adrenal e no ovário). O colesterol hepático é excretado pela bile (SCHIAVO *et al.*, 2003; FORTI e DIAMENT, 2006).

3.8 PERFIL LIPÍDICO

O perfil lipídico é definido pelas determinações bioquímicas do colesterol total, colesterol ligado à HDL ou HDL-colesterol (HDL-C), triglicerídeo e do colesterol ligado à LDL ou LDL-colesterol (LDL-C) após jejum de 12 a 14 horas. Com base em estudos epidemiológicos, considera-se nível de colesterol sanguíneo menor que 200mg/dL desejável; de 200 a 239mg/dL, limítrofe alto; e acima de 240mg/dL, ele é alto ou de hipercolesterolemia. Os níveis desejáveis de HDL devem ser superiores a 50mg/dL para mulheres e para homens, superiores a 40mg/dL. Para triglicerídeo, os níveis sanguíneos desejáveis devem ser inferiores a 150mg/dL e para LDL, inferiores a 160mg/dL (KRUMMEL,

2002; IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

3.8.1 HIPERCOLESTEROLEMIA

A hipercolesterolemia é caracterizada pela alta concentração de colesterol no sangue, resultante da superprodução e/ou subutilização de LDL. Pode ser provocada por duas irregularidades metabólicas, doenças genéticas e uma dieta rica em colesterol (VOET *et al.*, 2000). A *American Heart Association* indica, para prevenção primária da doença aterosclerótica coronariana, consumo diário de até 300mg de colesterol.

Doenças genéticas específicas do metabolismo de lipoproteínas podem influenciar no metabolismo do colesterol e nos níveis da produção do colesterol e de outras gorduras, e seus efeitos se apresentam no aumento do colesterol e triglicerídeos (KALIORA e DEDOUSSIS, 2007).

A ingestão de uma dieta rica em colesterol promove a entrada deste colesterol em excesso nos hepatócitos, como remanescentes dos quilomícrons, e suprimem a síntese da proteína receptora de LDL, levando a altos níveis de LDL circulante (VOET *et al.*, 2000).

Muitos estudos têm mostrado que drogas hipolipemiantes diminuem os eventos cardiovasculares entre 25 e 38%. Entretanto, o efeito da estatina e de outras terapias hipolipemiantes é muito pequeno na estenose causada pela placa de gordura. A dissociação entre o grau de estenose e o risco para doenças cardiovasculares confirma que o estado funcional da placa de aterosclerose e não apenas o seu tamanho ou o grau de invasão luminal é que determina as síndromes coronárias agudas (BROWN *et al.*, 2001; LIBBY, 2006).

3.9 FUNÇÃO ENDOTELIAL E DOENÇA CARDIOVASCULAR

O endotélio tem função regulatória na manutenção da homeostase vascular pela liberação de várias substâncias biologicamente ativas tais como os fatores vasodilatador, antitrombótico e antitumoral, que agem na parede e no lúmen do vaso sanguíneo. Entre estes fatores, destacam-se o óxido nítrico (NO), que é liberado em resposta a agentes vasoativos, e alterações hemodinâmicas (RAKICI *et al.*, 2005; VITA, 2005; KALS *et al.*, 2006).

O óxido nítrico foi o primeiro a ser descrito como um vasodilatador derivado do endotélio, e suas ações estão associadas à manutenção do tônus vascular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, efeito antiproliferativo e efeito antioxidativo (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003).

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, que funciona como uma molécula sinalizadora. Possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado que reage facilmente com o oxigênio, ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ou metais de transição como ferro, cobalto, manganês ou cobre (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; AL-SHAER *et al.*, 2006).

A meia-vida do óxido nítrico varia em média de 3 a 60 segundos, cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos. Sua atividade foi relatada em endotélio, cerebelo, nervos não adrenérgicos e não colinérgicos, macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrointestinal e miocárdio (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003).

A síntese do óxido nítrico é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), envolvendo duas etapas: na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos hidrogênios guanidínicos da L-arginina para gerar N^G-hidroxi-L-arginina (NHA), e para realizar esta reação, são utilizados NADPH e oxigênio (O_2); na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina, utilizando como co-fatores nesta reação, a flavina

adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH_4) (DUSSE *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007^b).

Três isoformas de NOS têm sido purificadas em diferentes tecidos de mamíferos. São agrupadas em duas categorias distintas: a NOS constitutiva (c-NOS), que está envolvida na sinalização celular, dependente de íons de cálcio e de calmodulina, e a NOS induzível (i-NOS), sintetizada por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DUSSE *et al.*, 2003). A isoforma I ou óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) e a isoforma III ou óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) são do grupo das constitutivas. A isoforma II ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) é do grupo da NOS induzível (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

A eNOS está localizada na membrana da célula endotelial. Em resposta a agonistas como a bradicina, acetilcolina, adenosina difosfato, serotonina, entre outros, ou quando há um aumento do atrito sobre a camada endotelial exercido pelas células circulantes, ocorre a fosforilação da eNOS, promovendo sua translocação para o citosol e sua ativação levando à produção de NO (DUSSE *et al.*, 2003).

O NO produzido na célula endotelial atravessa rapidamente o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e para o lúmen vascular. No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GCa), mudando sua conformação e tornando-a ativa. Esta enzima catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento da concentração de GMPc resulta no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003).

O NO, que se difunde para o lúmen vascular, pode penetrar nas plaquetas, principalmente naquelas que se encontram agrupadas na parede dos vasos ou nas hemácias. No interior das plaquetas, o NO promove um aumento de GMPc e a consequente diminuição do cálcio livre (Ca^{++}), de modo semelhante ao que ocorre nas células do músculo liso vascular. O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de Ca^{++} na célula, a inibição da liberação de Ca^{++} do retículo

endoplasmático e o aumento do sequestro para esta organela celular. Com a redução do cálcio livre, a ativação plaquetária estará inibida, conseqüentemente, o processo de agregação também. As plaquetas humanas possuem eNOS, portanto, são produtoras de NO. Tanto o NO endógeno quanto o exógeno são importantes no controle da função plaquetária (DUSSE *et al.*, 2003).

Vários estudos têm demonstrado que a disfunção endotelial está associada ao aumento do risco de eventos cardiovasculares. Muitas intervenções são usadas para reduzir o risco cardiovascular que, conseqüentemente, melhoram a função endotelial, podendo ser destacados as terapias hipolipimeantes, os inibidores enzimáticos de angiotensina, os bloqueadores de angiotensina, a suspensão do uso de cigarro e a prática de exercício físico (VITA e KEANEY, 2002; WIDLANSKY *et al.*, 2003).

3.9.1 FORMAÇÃO DA PLACA DE ATEROMA

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica na camada íntima das artérias de médio a grande calibre, que resulta em doença cardíaca isquêmica ou doença arterial coronariana (ataque cardíaco, por exemplo), doença cerebrovascular (acidente vascular cerebral, por exemplo), doenças da aorta e artérias, incluindo hipertensão e doença vascular periférica. Em 2008, ataques do coração e acidentes vasculares cerebrais foram responsável por 7,3 milhões e 6,2 milhões de mortes, respectivamente (WHO, 2011).

O processo de aterosclerose se inicia com agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como hipercolesterolemia, fumo, inatividade física, uso exagerado de álcool, entre outros (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007; WHO, 2011). Contudo, o fator de risco mais importante é o acúmulo de colesterol nas artérias que é considerado a causa direta da aterosclerose (HELLER *et al.*, 1998), e mesmo na

ausência de outros fatores de risco, a hipercolesterolemia é suficiente para estimular o desenvolvimento da lesão (KUMAR *et al.*, 2008).

A disfunção endotelial ocasionada pelos fatores de riscos assim como pelo estresse oxidativo estimula a expressão de moléculas como a de adesão da célula vascular (VCAM-1), a de adesão intercelular 1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2), a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), a seletina e as citocinas, que são expressas na superfície da célula endotelial através da via mediada pelo fator nuclear *kappa* B (NFkB) e por citocinas próinflamatória como as interleucina-1 β (IL-1 β), e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), aumentando a adesão de monócitos, neutrófilos, linfócitos T e alguns tipos de leucócitos, que são encontrados nas placas de aterosclerose de formação recente (Figura 8) (DUSSE *et al.*, 2003; LIBBY, 2006).

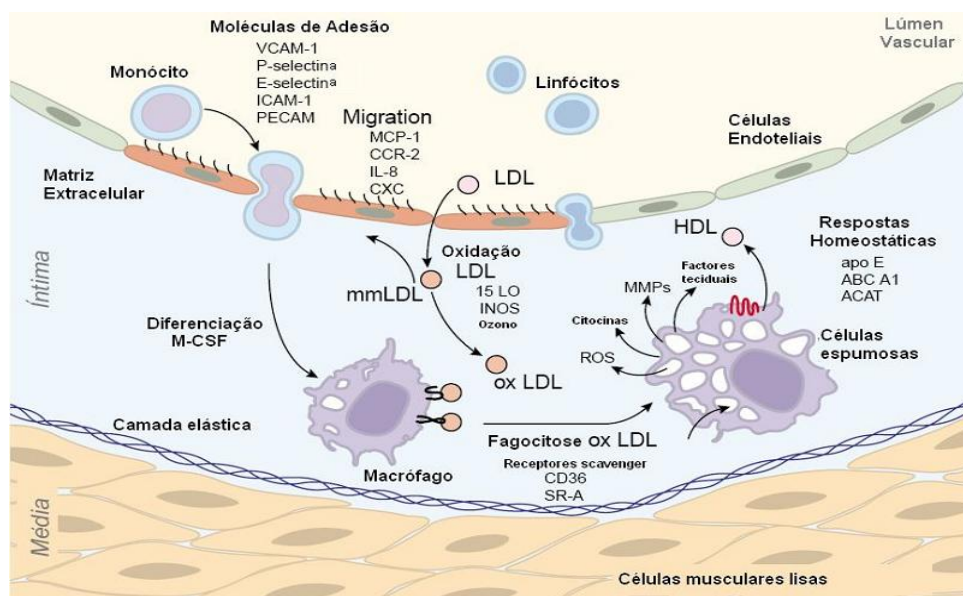


Figura 8: Esquemática do início da disfunção endotelial precursora da formação da placa aterosclerótica (Borges 2009, adaptado de Scott 2004).

Os monócitos aderidos ao endotélio penetram na parede endotelial e entram na camada íntima do vaso pelo mecanismo de diapedese. No interior da íntima, monócitos maduros se transformam em macrófagos aumentando a expressão de receptores coletores e captam lipoproteínas modificadas, principalmente as LDLs oxidadas (ox-LDLs). No citoplasma dos macrófagos, é acumulado éster de colesterol, dando origem às

células espumosas. Estes macrófagos se multiplicam e liberam vários fatores de crescimento e citocinas inflamatórias como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), que amplificam e sustentam os sinais inflamatórios (DUBICK e OMAYE, 2001; YOSHIDA, 2004; LIBBY, 2006).

Entretanto, este acúmulo de macrófagos dentro da camada íntima significa um primeiro estágio (CASELLA FILHO *et al.*, 2003). A migração e proliferação das células musculares lisas (CMLs) da camada média para a camada íntima da artéria e o depósito de matriz extracelular (MEC) contribuem para o crescimento do ateroma e para a formação da placa fibrosa envolvente, assim, transformando uma estria gordurosa em um ateroma maduro (SCOTT, 2004; STOLL *et al.*, 2006; IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007; KUMAR *et al.*, 2008).

Este evento ocorre mediante estímulos de alguns fatores de crescimento tais como: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), que é liberado pelas plaquetas, pelos macrófagos, células endoteliais e pelas próprias CMLs; fator de crescimento de fibroblastos; e fator de crescimento transformante alfa (TGF- α). As CMLs recrutadas sintetizam MEC, principalmente colágeno, que estabilizam as placas ateroscleróticas (Figura 9) (KUMAR *et al.*, 2008).

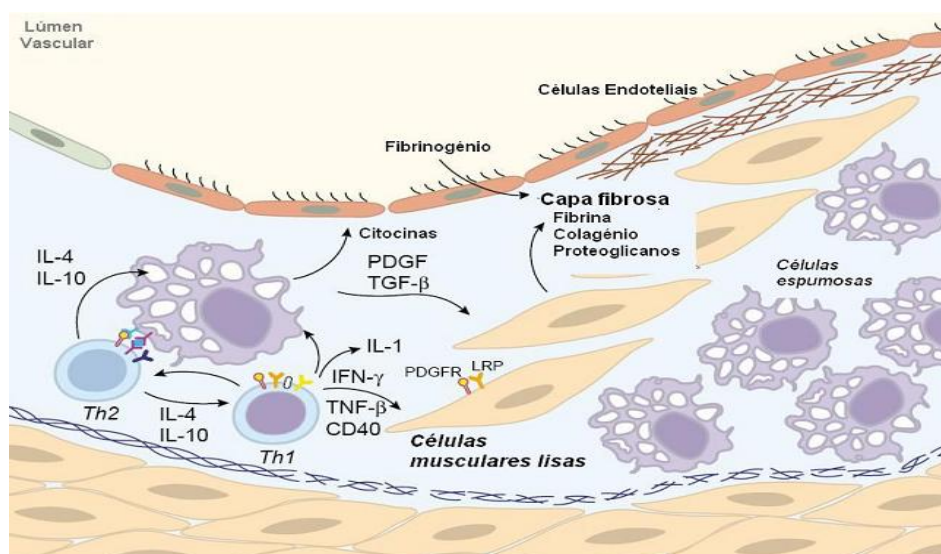


Figura 9: Esquematização da progressão de uma placa aterosclerótica (Borges 2009, adaptado de Scott 2004).

O colágeno produzido pelas CMLs é estimulado pelo fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas e em menor extensão pela IL-1. No entanto, o processo inflamatório interfere na integridade do colágeno da matriz intersticial em duas vias: bloqueando a criação de uma nova fibra de colágeno e estimulando a destruição do colágeno existente (LIBBY, 2006).

Na degradação do colágeno, participa o linfócito T, que expressa o ligante CD40, além de estimular a produção de IL-1, promovendo a produção de enzimas nos macrófagos como as metaloproteinases MMP-1, MMP-8 e MMP-13. Os macrófagos produzem ainda o fator tecidual, um potente pró-coagulante que enfraquece a camada fibrosa que protege o núcleo lipídico, e a placa aterosclerótica estará propensa à ruptura (Figura 10) (HORTON *et al.*, 2001; YOSHIDA, 2004; LIBBY, 2006).

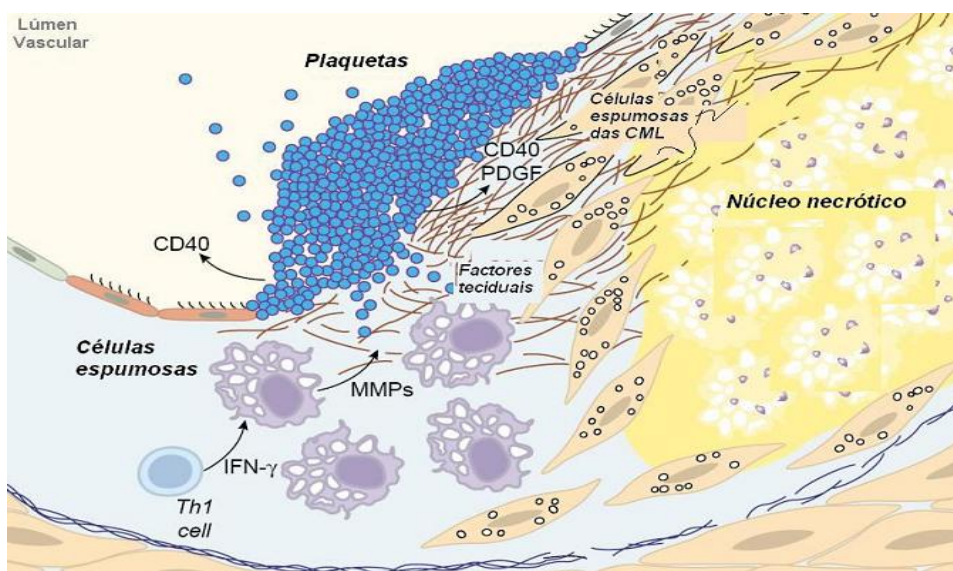


Figura 10: Esquematização de uma placa aterosclerótica instável (Borges 2009, adaptado de Scott 2004).

A ruptura da placa expõe material lipídico altamente trombogênico. O incremento na atividade das plaquetas e dos fatores de coagulação inicia a formação do trombo branco, rico em plaquetas e fibrinas. A atração de mais plaquetas, a liberação de fatores quimiotáticos e a incorporação de eritrócitos contribuem para a formação do trombo vermelho (RAUDALES *et al.*, 2006).

O sangue coagulado pode se aderir à placa, diminuindo o fluxo de sangue e produzindo trombose. Este coágulo também pode se romper da parede do vaso sanguíneo e se alojar em uma pequena artéria produzindo embolismo, fechando o fluxo sanguíneo que supre os tecidos, causando as importantes complicações agudas da aterosclerose (DUBICK e OMAYE, 2001; LIBBY, 2006).

O mecanismo preciso para considerar a vulnerabilidade da placa e ruptura ainda não é completamente entendido, mas dados sugerem que fatores como o local de inflamação dentro da placa, redução da capa fibrosa e acumulação de lipídio na placa são importantes. O desenvolvimento de uma placa vulnerável e os subsequentes eventos isquêmicos representam uma profunda perda na homeostase vascular (VITA, 2005).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – S. P., v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

ALBERTS, A. W. Lovastatin and simvastatin-inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. **Cardiology**, v. 77 (Suppl. 4), p. 14-21, 1990.

ALBERTS, A. W.; CHEN, J.; KURON, G.; HUNT, V.; HUFF, J. ET AL. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, p. 3957-61, 1980.

AL-SHAER, M. H.; CHOUERI, N. E.; CORREIA, M. L. G.; SINKEY, C. A.; BARENZ, T. A.; HAYNES, W. G. Effects of aging and atherosclerosis on endothelial and vascular smooth muscle function in humans. **International Journal of Cardiology**, v.109, p.201-206, 2006.

ALVES, R. J.; DIAMENT, J.; AMÂNCIO, R. F.; FORTI, N.; MARANHÃO, R. C. Ausência de efeito do captopril no metabolismo de uma emulsão lipídica artificial semelhante aos quilomícrons em pacientes hipertensos e hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 83, n. 6, p. 608-609, 2004.

ARAÚJO, R. G.; CASELLA FILHO, A.; CHAGAS, A. C. P. Ezetimiba: farmacocinética e terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 85 (Suplemento V), p. 20-24, 2005.

BAHIA, L.; AGUIAR, L. G. K.; VILLELA, N. R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. Endotélio e aterosclerose. **Revista da SOCERJ**, v. 17, n.1, p. 26-32, 2004.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BALLINGER, S. W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1278 – 1295, 2005.

BERROUGUI, H.; GRENIER, G.; LOUED, S.; DROUIN, G.; KHALIL, A. A new insight into resveratrol as an atheroprotective compound: inhibition of lipid peroxidation and enhancement of cholesterol efflux. **Atherosclerosis**, v. 207, p. 420-427, 2009.

BERTELLI, A. Wine, research and cardiovascular disease: Instructions for use. **Atherosclerosis**, v. 195, p. 242-247, 2007.

BORGES, L. G. **Função Endotelial e a sua relação com a composição da placa aterosclerótica**. 64 f. Tese (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente – Departamento de Biologia Animal - Faculdade de Ciências) – Universidade de Lisboa, Portugal, 2009.

BORRIELLO, A.; V. CUCCIOLLA, V.; RAGIONE, F. D.; GALLETTI, P. Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 618 – 625, 2010.

BRASIL, Lei nº 7678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 21561, 9 nov. 1988. Seção 1.

BRIDLE, P. e TIMBERLAKE, C. F. Antocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1-2, p.103-109, 1997.

BROWN, B. G.; ZHAO, X. Q.; CHAIT, A. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. **The New England Journal of Medicine**, v.345, p.1583-92, 2001.

BROWN, L.; KROON, P.A.; DAS, D.K.; DAS, S.; TOSAKI, A.; CHAN, V.; SINGER, M.V.; FEICK, P. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 33, n. 9, p. 1513-1523, 2009.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MC PHAIL, D. B.; LISTER, C.; MATHEWS, D.; MC LEAN, M. R.; LEAN, M. E. J.; DUTHIE, G. G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220-230, 2000.

CARVALHO, M. H., NIGRO, D., LEMOS, V. S., TOSTES, R. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 76-88, 2001.

CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, R. G.; GALVÃO, T. G.; CHAGAS, A. C. P. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 11, n. 3, p. 14-19, 2003.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-423, 2002.

CHONG, J.; POUTARAUD, A. e HUGUENEY, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. **Plant Science**, v. 177, p. 143-155, 2009.

CHRZAŚCIK, I. Analysis of biologically active stilbene derivatives. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 70-80, 2009.

COSTA, N. M. B. Alimentos: componentes nutricionais e funcionais. In: **Biotecnologia e Nutrição: saiba como o DNA pode enriquecer os alimentos**. Ed. Nobel – S. P., cap. 2, 2003, p. 31-69.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. 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.

DAS, M.; DAS, D. Resveratrol and cardiovascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, 2010.

DÁVALOS, A.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C.; CERRATO, F.; MARTÍNEZ-BOTAS, J.; GÓMEZ-CORONADO, D.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; LASUNCIÓN, M. A. Red grape juice polyphenols alter cholesterol homeostasis and increase LDL-Receptor activity in human cells in vitro. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1766-1773, 2006.

DEGÁSPARI, C. H. e WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A.R., PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: carotenoids, antocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DELL'AGLI, M.; BUSCIALA, A.; BOSISIO, E. Vascular effects of wine polyphenols. **Cardiovascular Research**, v.63, p.593-602, 2004.

DONG, Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 145-150, 2003.

DUBICK, M. A.; OMAJE, S. T. Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. In: Wildman, R. E. C. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Ed. CRC Series in Modern Nutrition, 2001, cap. 14, p.235-260.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p. 343-350, 2003.

FABRIS, S.; MOMO, F.; RAVAGNAN, G.; STEVANATO, R. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. **Biophysical Chemistry**, v. 135, p. 76–83, 2008.

FALLER, A.L.K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n.2, p. 211-218, 2009.

FEARON, I. M.; FAUX, S. P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 47, p.372-381, 2009.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FERREIRA, M. A.; JÚNIOR, M. J. P.; SANTOS, A. O.; HERNANDES, J. L. Modificação parcial do ambiente de cultivo da videira Cabernet Sauvignon sobre diferentes porta-enxertos: efeito sobre a produção e o teor de sólidos solúveis. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p.439-445, 2004.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 87, p. 671-679, 2006.

FRAGA, C. G.; GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 435-445, 2010.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sci.**, v. 66, p. 663-673, 2000.

FU, W.; CONKLIN, B. S.; LIN, P. H.; LUMSDEN, A. B.; YAO, Q.; CHEN, C. Red wine prevents homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. **Journal of Surgical Research**, v. 115, p. 82-91, 2003.

GALVANO, F.; FAUCI, L. L.; LAZZARINO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N. C.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 2-11, 2004.

GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, H. C. F. Fisiologia das lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark Editora Ltda, 1992. Cap. 1, p. 1-30.

GIRARD, B.; MAZZA, G. Functional grape and citrus products. In: Mazza, G. **Functional foods: Biochemical & Processing Aspects Technomic Publishing Co. Inc.** Lancaster, 1998. Cap. 5, p. 139-191.

GOLDE, P. H.; WESTELAKEN, M.; BOUMA, B. N.; WIEL, A. Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. **Life Sciences**, v. 74, p. 1159-1166, 2004.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p. 210-218, 2010.

HALLS, C. e YU, O. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p.77-81, 2008.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A. **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. 1ª Ed. São Paulo: Ed. Edgard Blücher LTDA, 2001, v. 4, cap. 2, p. 21-68.

HELLER, F.R., DESCAMPS, O., HONDEKIJN, J. LDL oxidation: therapeutic perspectives. **Atherosclerosis**, Suppl. 137, S25-S31, 1998.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; WOOD, C.D.; CASTRO-OBREGÓN, S.; COVARRUBIAS, L. Reactive oxygen species: A radical role in development? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 130-143, 2010.

HORTON, D. B.; LIBBY, P.; SCHONBECK, U. Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity. **Annals the New York Academy of Sciences**, v. 947, p. 329-336, 2001.

ISTVAN, E. S. e DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science**, v. 292, p. 1160-64, 2001.

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, Supl. I, p. 2-19, 2007.

JIMÉNEZ, R.; LÓPEZ-SEPÚLVEDA, R.; KADMIRI, M.; ROMERO, M. VERA, R.; SÁNCHEZ, M.; VARGAS, F.; O'VALLE, F.; ZARZUELO, A.; DUEÑAS, M.; SANTOS-BUELGA, C.; DUARTE, J. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: Role of endothelin-1 and NADPH oxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 462-473, 2007.

JONES, P. J. H. Regulation of cholesterol biosynthesis by diet in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 438-446, 1997.

JONES, P. J. H.; KUBOW, S. Lipídios, esteróis e seus metabólitos. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9ª Ed. Barueri – SP: Manole, 2003, cap. 4, p. 71-101.

JORGE, P. A. R.; ALMEIDA, E. A.; OZAKI, M. R.; JORGE, A. C. Efeitos da atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e sinvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 4, p. 314-319, 2005.

KADENBACH, B.; RAMZAN, R.; VOGT, S. Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 4, 2009.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V. Z. Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. **Pharmacological Research**, v. 56, p. 99-109, 2007.

KALS, J.; KAMPUS, P.; KALS, M.; PULGES, A.; TEESALU, R.; ZILMER, M. Effects of stimulation of nitric oxide synthesis on large artery stiffness in patients with peripheral arterial disease. **Atherosclerosis**, v. 185, p. 368-374, 2006.

KASDALLAH-GRISSA, A.; MORNAGUI, B.; AOUANI, E.; HAMMAMI, M.; MAY, M.; GHARBI, N.; ABDELAZIZ, K.; EL-FAZAÂ, S. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. **Life Sciences**, v.80, p. 1033-1039, 2007.

KIKURA, M.; IVEY, J. H.; SAFON, R. A.; LEE, M. K.; SZLAM, F. The influence of red wine or white wine intake on platelet function and viscoelastic property of blood in volunteers. **Platelets**, v.15, p.37-41, 2004.

KLASTSKY, A. L. Alcohol, cardiovascular diseases and diabetes mellitus. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 237-247, 2007.

KLATSKY, A. L.; FRIEDMAN, G. D.; ARMSTRONG, M. A.; KIPP, H. Wine, liquor, beer, and mortality. **American Journal of Epidemiology**, v. 158, n. 6, p.585-595, 2003.

KRUMMEL, D. Nutrição na doença cardiovascular. In: MAHAN, L. K. & ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10^a ed. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 26, p. 539-575.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins: patologia básica**. 8^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008. Cap. 10, p. 371-413.

KWAK, B. R.; MULHAUPT, F.; MACH, F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. **Autoimmunity Reviews**, v. 2, p. 332-338, 2003.

LAWS, P. E.; SPARK, J. I.; COWLED, P. A.; FITRIDGE, R. A. The role of statins in vascular disease. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v.27, p.6-16, 2004.

LEE, J.; RENNAKER, C. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. **Food Chemistry**, v. 105, p. 195-203, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Sarvier, 1995. Cap. 20, p. 477-513.

LEIFERT, W. R.; ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, v. 28, p.729-737, 2008.

LEIGHTON, F.; SAN MARTÍN, A.; CASTILHO, O.; POLLAK, F.; PEREZ, D. D.; STROBEL, P. Red wine, white wine e diet, intervention study. **Effect on cardiovascular risk factors**. Proc. XXV Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, París, June 19-23, pp.63-70, 2000.

LEIGHTON, F.; URQUIAGA, I. Changes in cardiovascular risk factors associated with wine consumption in intervention studies in humans. **Ann. Epidemiol.**, v.17, p.S32-S36, 2007.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S.; Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. São Paulo, v.18, n.2, p.60-65, 2003.

LIAO, J. K. e LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.89-118, 2005.

LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83 (suppl.), p.456S-460S, 2006.

LUDMAN, A.; VENUGOPAL, V.; YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Statins and cardioprotection – More than just lipid lowering? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 30-43, 2009.

LÜPEZ-VELEZ, M.; MARTÍNEZ- MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, p.233-244, 2003.

LUZ, P. L.; SERRANO Jr., C. V.; CHACRA, A. P.; MONTEIRO, H. P.; YOSHIDA, V. M.; FURTADO, M.; FERREIRA, S.; GUTIERREZ, P. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 65, p. 150-159, 1999.

MACHADO, R. M. D. **Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão**. 137 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim da CEPPA**, Curitiba - P. R., v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

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. e PASTORE, G. M. Compostos Fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do CEPPA**, v.22, n.2, p.233-253, 2004.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação de mosto de uva fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V.27, n.2, p. 281-284, 2007.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-47, 2004.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81 (suppl.), p. 230S-242S, 2005.

MAYES, P. A. Colesterol: síntese, transporte e excreção. In: Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. **Harper: Bioquímica**. 7^a ed. São Paulo: Atheneu, 1994. Cap. 28, p. 262-274.

MELLO, L.M. R. Produção e comercialização de uvas, vinhos e derivados panorama 2001 (parte 1). **EMBRAPA uva e vinho**, 2002. Disponível em: www.Clubedofazendeiro.com.br/Cietec/ArtigosTexto.asp?Codigo=672. Acessado em 05/06/09.

MERX, M. W.; WEBER, C. Benefits of statins beyond lipid lowering. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 3-4, p. e325-e331, 2008.

MIELE, M.; COLDEBELLA, A.; WAQUIL, P. D.; MIELE, A. Segments of competition in south brazilian wineries. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Brazil), v.64, n.3, p.227-234, 2007.

MÜLLEDER, U.; MURKOVIC, M. & PFANNHAUSER, W. Metabolism of cyaniding glucoside of elderberry. In: **Biologically active phytochemicals in food analysis, metabolism, bioavailability and function**, London: RSC, 2001, p. 421-425.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p. 418-425, 2001.

NIKFARDJAM, M. S. P.; LÁSZLÓ, G.; DIETRICH, H. Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from *botrytized* grapes. **Food Chemistry**, v.96, p. 74-79, 2006.

- NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, article in press, 2010.
- OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; VREE, T. B.; KATAN, M.B. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1200-3, 2000.
- OVASKAINEN, M.; TÖRRÖNEN, R.; KOPONEN, J. M.; SINKKO, H.; HELLSTRÖM, J.; REINIVUO H.; MARTTILA, P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. **Journal of Nutrition**, v.138, p.562-566, 2008.
- PACE-ASCIAC, C. R.; ROUNOVA, O.; HAHN, S. E.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. **Clinica Chimica Acta**, v.246, p.163-182, 1996.
- PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PARADIES, V.; RUGGIERO, F.M. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p.1286–1295, 2010.
- PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. Redox sinaling in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 71, p. 247-258, 2006.
- PENNA, C.; MANCARDI, D.; RASTALDO, R.; PAGLIARO, P. Cardioprotection: A radical view. Free radicals in pré and postconditioning. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, p. 781-793, 2009.
- PENNA, N.G.; DAUDT, C. E.; HENRIQUES, J. A. P. Comportamento de ésteres hidroxicinâmicos durante a vinificação de vinhos brancos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n.7, p. 2001.
- PETTI, S. e SCULLY, C. Polyphenols, oral health and disease: A review. **Journal of Dentistry**, v.37, p.413-423, 2009.
- PINHO, R. A.; ARAÚJO, M. C.; GHISI, G. L. M.; BENETTI, M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p.549-555, 2010.
- PORTALUPPI, F.; BOARI, B.; MANFREDINI, R. Oxidative stress in essencial hypertension. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 14, p. 1695-1698, 2004.
- QUINCOZES-SANTOS, A.; ANDREAZZA, A. C.; NARDIN, P.; FUNCHAL, C.; GONÇALVES, C.; GOTTFRIED, C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 glioma-cells. **Neuro Toxicology**, v. 28, p.886-891, 2007.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v.72, p. 1439-1452, 2006.

RAKICI, O.; KIZILTEPE, U.; COSKUN, B.; ASLAMACI, S.; AKAR, F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. **International Journal of Cardiology**, v.105, p.209-215, 2005.

RAUDALES, J. C.; ZAGO, A. C.; ZAGO, A. J.; CAMPOS, M. R.; CASCO, M. F.; WACHLESKI, J. Placa Coronária Aterosclerótica Vulnerável: Estado Atual. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v.14, n.3, p. 314-323, 2006.

RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ, P.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2815-2822, 2008.

ROBERTS, C.K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Science**, v. 84, p.705-712, 2009.

RODEIRO, I.; DONATO, M.T.; LAHOZ, A.; GARRIDO, G.; DELGADO, R.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Interactions of polyphenols with the P450 system: possible implications on human therapeutics. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, v.8, p. 97-106, 2008.

RODRIGUES, F. P. **Efeito do tratamento crônico com extrato de vinho tinto sobre a função cardiovascular de ratos com hipertensão arterial pulmonar**. 58 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**, v. 658, p. 68-94, 2008.

SANTOS FILHO, R. D.; MARANHÃO, R. C. Hipertrigliceridemia e dislipidemia pós-prandial. **HiperAtivo**, v. 6, n. 2, p.152-157, 1999.

SAURA-CALIXTO, F.; DÍAZ-RUBIO, M. E. Polyphenols associated with dietary fibre in wine: A wine polyphenols gap? **Food Research International**, v. 40, p. 613-619, 2007.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 56, p. 276-282, 2002.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J. R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. Porto Alegre, v.10, n.4, p.308-313, 2004.

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Genetics and Development**, v. 14, p. 271-279, 2004.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p. 567-579, 2007.

SILVA, P. C. F. **Propriedades antioxidantes *in vitro* de uvas branca e de uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados**. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOUTO, A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of trans-resveratrol concentrations in brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 441-445, 2001.

STINTZING, F. C. e CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science e Technology**, v.15, p. 19-38, 2004.

STOLL, G. e BENDSZUS, M. Inflammation and Atherosclerosis: Novel insights into plaque formation and destabilization. **Stroke**, v. 37, p.1923-1932, 2006.

TEDESCO, I; RUSSO, G. L.; NAZZARO, F.; RUSSO, M.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p. 505-511, 2001.

THIERY, J.; NEBENDHAL, K.; WALLI, A. K. Effects of three different HMGCoA reductase inhibitors on hypercholesterolemia and atherosclerosis in cholesterol fed-rabbits. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 11, p. 148, 1991.

THOMAS, J. A. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9ª Edição. Barueri – S.P.: Manole, 2003. Vol. 1, cap. 46, p. 801-811.

TOMERA, J. F. Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 129-138, 1999.

TSUCHIYA, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1089-1096, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007^a.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; SILVA, M. A. M.; GOMES, A. C. M. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 14, n. 4, p. 269-274, 2007^b.

VÁSQUEZ-VIVAR, J. Tetrahydrobiopterin, superoxide, and vascular dysfunction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1108-1119, 2009.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. 1^a Ed. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2005, v. 1, p. 550.

VITA, J. A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81 (suppl), p. 292S-7S, 2005.

VITA, J. A.; KEANEY, J.F. Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? **Circulation**, v. 106, p. 640-642, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre – R.S.: Artmed, 2000. Cap. 19, p. 562-610.

VRHOVSEK, U.; WENDELIN, S.; EDER, R. Effects of various vinification techniques on the concentration of cis- and trans-resveratrol and resveratrol glucose isomers in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, p. 214-220, 1997.

WAITZBERG, D. L.; BORGES, V. C. Gorduras. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3^a Ed. São Paulo: Atheneu, 2004, cap. 4, p. 55-78.

WIDLANSKY, M.E.; GOKCE, N.; KEANEY, J.F. Jr.; VITA, J.A. The clinical implications of endothelial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, p. 1149-1160, 2003.

WILLIAMS, M. J. A.; SUTHERLAND, W. H. F.; WHELAN, A. P.; McCORMICK, M. P.; de JONG, S. A. Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. **Metabolism**, v.53, p.318-323, 2004.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81 (suppl.), p. 243S-255S, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **The World Health Report**. Geneva: 2002. 66 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva; 2003. 148 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva: 2011. 153 p.

YANG, C.S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YOSHIDA, W. B. O Processo Aterosclerótico: da Disfunção Endotelial à Lesão Complexa. In: Sitrângulo Jr. *et al.* **Doença Aterosclerótica Periférica**. São Paulo: BBS Editora, 2004. Cap. 1, p. 11-27.

ZERN, T. L. e FERNANDEZ, M. L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. **Journal of Nutrition J**, v.135, p. 2291-2294, 2005.

ZOU, J.; WANG, Z.; HUANG, Y.; CAO, K.; WU, J. M. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 11, p. 317-320, 2003.

CAPÍTULO 1

EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE VINHO TINTO, VINHO BRANCO E SUCO DE UVA LIOFILIZADOS, RESVERATROL E SINVASTATINA NA AORTA DE COELHOS ADULTOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. No ano de 2008, das 58 milhões de mortes no mundo, 30% foram por doenças cardiovasculares. As doenças cardiovasculares incluem doenças do coração, doenças vasculares do cérebro e doenças dos vasos sanguíneos (WHO, 2011).

As doenças dos vasos sanguíneos são provocadas por fatores de risco ambientais e metabólicos. Um dos mais importantes fatores de riscos metabólico é a hipercolesterolemia, resultante de alterações no metabolismo lipídico, em que são observadas altas concentrações plasmáticas de colesterol e LDL colesterol, causando esta condição dano e disfunção endotelial (CHEN *et al.*, 2005; PINHO *et al.*, 2010; WHO, 2011; TRIANTI *et al.*, 2011).

A disfunção endotelial implica produção ou disponibilidade diminuída de óxido nítrico (NO) e/ou um desequilíbrio entre os fatores do endotélio, responsáveis pelo relaxamento e contração do vaso sanguíneo. O NO é produzido pelas células endoteliais, através da enzima óxido nítrico sintase, e tem função vasodilatadora, desempenhando um papel fundamental na regulação do tônus vascular e na função vasomotora do vaso sanguíneo (ZHANG, 2008).

Associado à disfunção endotelial está o aumento do risco do desenvolvimento da aterosclerose, doença inflamatória crônica do vaso

sanguíneo que envolve o acúmulo de lipídeos na camada íntima da artéria, resultando em formação de lesões vasculares, chamadas de ateromas ou de placas fibrogordurosas, caracterizadas por inflamação, fibrose e morte celular (LUNDBERG e HANSSON, 2010; PALOZZA *et al.*, 2010) .

Estudos em animais têm demonstrado que os compostos não alcoólicos do vinho tinto são capazes de corrigir a disfunção endotelial, inibindo a progressão da aterosclerose. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as propriedades antiaterogênicas do vinho tinto, incluindo a modulação dos níveis de colesterol plasmático, a inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), inibição da agregação plaquetária, estímulo à síntese da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), entre outros efeitos protetores (ESTRUCH, 2000; AUGER *et al.*, 2005; LEIGHTON e URQUIAGA, 2007; CHO *et al.*, 2008; MODUN *et al.*, 2008; VOLP *et al.*, 2008).

A quantidade e a natureza dos compostos fenólicos no vinho tinto, vinho branco e suco de uva são diferentes (PAIXÃO *et al.*, 2007). O vinho tinto contém 1 a 4g/L de polifenóis; o vinho branco, 0,2 a 0,3g/L; e o suco de uva integral, 1,6 a 2,2 g de ácido gálico/L (MAMEDE E PASTORE, 2004; SAUTTER *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos do vinho tinto incluem taninos, quercetina, catequina, epicatequina e resveratrol (DAS e DAS, 2010). Os componentes ativos do vinho branco são o ácido cafeico, tirosol, ácido chiquímico e resveratrol (THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2008). E no suco de uva, os polifenóis de maior importância são a miricetina, quercetina, procianidina, catequinas, antocianinas e *trans*-resveratrol (DÁVALOS *et al.*, 2006).

Muitos autores atribuem ao resveratrol o efeito protetor contra as doenças cardiovasculares do vinho tinto, considerando-o a possível explicação para o *paradoxo Francês* (SATO *et al.*, 2002; ZOU *et al.*, 2003; AHN *et al.*, 2008). O resveratrol é uma fitoalexina produzida por poucas espécies de plantas, entre elas, se destacam as uvas (DAS e DAS, 2010). Na uva, o resveratrol é sintetizado na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico, dano mecânico ou irradiação da luz ultravioleta (SAUTTER *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2009). Esses fatores e o método de processamento empregado para os diferentes produtos da

uva contribuem para o conteúdo do resveratrol (NIKFARDJAM *et al.*, 2006). No vinho tinto, é encontrada uma concentração de resveratrol em torno de 0,1 a 14,3 mg/L; no vinho branco, de 0,1 a 2,1 mg/L; e no suco de uva, de 0,5 mg/L (MAMEDE e PASTORE, 2004; DUDLEY *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Zou *et al.* (2003) foi observado que a disfunção endotelial foi diminuída em coelhos hipercolesterolêmico que receberam doses de resveratrol (3mg/Kg/dia), vinho tinto (4mL/Kg/dia) e vinho tinto desalcoholizado (4mL/Kg/dia) por 12 semanas. Em outro estudo conduzido por Vinson *et al.* (2001), o consumo de vinho tinto e vinho tinto desalcoholizado diminuiu significativamente a aterosclerose em *hamsters* em relação ao álcool, indicando que possivelmente este efeito tenha sido provocado pelos polifenóis de tais bebidas.

Componentes não alcoólicos do vinho tinto, como os polifenóis, poderiam prevenir a disfunção endotelial e, conseqüentemente, a aterosclerose pelos efeitos antioxidantes e de interações com diferentes moléculas nos organismos vivos, complementando várias ações nas vias bioquímicas (SAIKO *et al.*, 2008). Portanto, mais estudos são necessários para avaliar se o conteúdo e os diferentes polifenóis em bebidas à base de uvas, como o vinho tinto, vinho branco e suco de uva, poderiam ser responsáveis por efeitos cardioprotetores distintos.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, sinvastatina e resveratrol nas alterações de parâmetros bioquímicos e histológicos da doença arterial coronariana em coelhos adultos hipercolesterolêmicos.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM), Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG) e no laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), todos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.2 PREPARAÇÃO DO VINHO TINTO, VINHO BRANCO, SUCO DE UVA, RESVERATROL E SINVASTATINA

O vinho tinto utilizado foi o *Cabernet Sauvignon*, o vinho branco foi o *Riesling Itálico* e o suco de uva integral, de marcas nacionalmente conhecidas, adquiridas no comércio local de Viçosa – M. G.

Os vinhos tinto, branco e suco de uva foram colocadas em bandejas inox no volume de 200 mL e evaporados por 2 horas à temperatura de 35°C em desidratador (Excalibur – Food Dehydrator Parallexx) para eliminação do álcool e parte da água. Depois foram liofilizados (Liofilizador Terroni Fauvel – LH0400/4L) por 24 horas à temperatura de -20°C. Este processo permite a eliminação do álcool e parte da água, diminuindo o volume e preservando as características naturais dos polifenóis presentes nestas bebidas. Para avaliar a perda de álcool, foram feitos cálculos dos volumes iniciais e finais dos processos, considerando o percentual alcoólico das bebidas vinho tinto 12% e vinho branco 10,5%.

Foram encapsulados 1mg de resveratrol em pó da marca DMS e 10mg de sinvastatina obtida em farmácia de manipulação (CNPJ 01.814.922/0001-03).

2.3 ANIMAIS E DIETA

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) aprovou o protocolo experimental (198/2009), e todos os animais foram tratados de acordo com o sugerido pelas diretrizes éticas internacionais para o cuidado com animais de laboratório. Foram utilizados 35 coelhos machos, albinos, da raça Nova Zelândia (Centro de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil), com idade de cinco meses, pesando entre 2,7 a 3,2Kg. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, mantidas em ambiente com controle de temperatura e umidade ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ umidade) e ciclos de luz de 12 horas claro/escuro. A água, administrada *ad libitum*, e 120g de ração para coelhos da marca Linha Natural da Purina foram oferecidos diariamente.

Após o período de adaptação de cinco dias, os animais foram divididos ao acaso em sete grupos: Grupo I, controle negativo (CN, $n=5$), alimentado com 120 g de ração e água à vontade; Grupo II, controle positivo (CP, $n=5$), alimentado com 120 g de ração contendo 1% de colesterol e água à vontade; Grupo III (E, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 10mg de sinvastatina em cápsulas e água à vontade; Grupo IV (R, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 1mg de resveratrol oferecido em cápsulas e água à vontade; Grupo V (VT, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 4mL de vinho tinto oferecido por gavagem oral e água à vontade; Grupo VI (VB, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 4mL de vinho branco oferecido por gavagem oral e água à vontade; Grupo VII (S, $n=5$), que recebeu 120 g de ração

contendo 1% de colesterol, 7,8mL de suco de uva integral oferecido por gavagem oral e água à vontade. As gavagens orais e cápsulas foram administradas diariamente, sempre no mesmo período do dia, durante 50 dias.

Os animais foram submetidos a três coletas de sangue: a coleta zero antes de iniciar os tratamentos, coleta com 25 dias e 50 dias de estudo experimental. Aos 50 dias do estudo, foi feito o sacrifício e foram coletados o sangue e os tecidos dos animais para análises posteriores.

O colesterol (VETEC, Brasil) foi adicionado à ração da marca Linha Natural da Purina, tendo passado novamente pelos processos de peletização e secagem no Centro de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

A seleção das doses do suco de uva, vinho branco e vinho tinto foi feita de acordo com o recomendado pela literatura científica para um homem adulto saudável, pesando 70kg, ou seja, 250mL de suco de uva e 150mL de , vinho tinto e vinho branco (CASTELNUOVO *et al.*, 2002), sendo feita relação proporcional ao peso do animal. A dose de sinvastatina foi a prescrita para um homem adulto pesando 70kg. A dose de resveratrol foi aproximadamente a contida em 150mL de vinho tinto (GERMAN e WALZEM, 2000).

2.4 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

O colesterol total, HDL colesterol e triacilglicerol foram determinados no plasma sanguíneo por métodos enzimáticos colorimétricos, usando Kit comercial (Bioclin, Brasil). O LDL foi determinado no plasma sanguíneo por métodos enzimáticos colorimétricos, usando Kit comercial (Human, Alemanha). A creatinina, proteínas totais e albumina foram determinadas no plasma sanguíneo por métodos colorimétricos, usando Kit comercial (Bioclin, Brasil). Foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue em tubos heparinizados,

centrifugados a 3.000rpm por 15 minutos para separação do plasma. Foram retiradas alíquotas de 1 mL e feitas as diluições dos volumes em 5 vezes com solução salina 0,9%. Os reagentes dos respectivos Kits foram preparados e a leitura realizada no analisador multiparamétrico de bioquímica - Alizé.

2.5 AVALIAÇÃO DAS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS

2.5.1 INCLUSÃO EM RESINA

Em todos os animais a aorta torácica foi rapidamente dissecada e fixada em solução de Karnovsky por um período de 24 horas e depois transferida para álcool 50%. Esta concentração foi utilizada para que as placas de gordura formada na parede arterial fossem mantidas intactas. Posteriormente, os cortes das artérias torácicas foram selecionados, sendo retirados os tecidos conjuntivos e os gordurosos associados à parte externa da artéria. As artérias foram seccionadas longitudinalmente para expor a camada íntima. Até o momento da coloração em Sudan IV, as artérias torácicas foram mantidas em solução tampão de fosfato 0,1M.

As artérias *en face* foram coradas com Sudan IV (TOLOSA *et al.*, 2003) para identificação das placas de gordura e fotografadas com câmera fotográfica Coolpix® (Nikkon), utilizando-se a mesma distância focal para todos os vasos. Os cortes das artérias, para inclusão em resina, foram feitos sobre os pontos que apresentavam maior acúmulo de gordura.

Para as avaliações histológicas, os fragmentos passaram por série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se ao final da série à inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Foram obtidas 20 secções de 3µm de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações referentes às artérias foram coradas com azul de

toluidina/borato de sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck), e as imagens foram obtidas em fotomicroscópio Olympus AX-70. Foram capturadas 5 imagens histológicas de cada animal, utilizando-se objetiva de 4 X.

2.5.2 INCLUSÃO EM PARAFINA

Fragmentos de artérias destinadas à análise histológica e de imunofluorescência foram fixados em paraformaldeído a 4%, por 24 horas. A desidratação foi feita em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) com trocas a cada 40 minutos. Os fragmentos foram diafanizados em xilol (álcool+xilol; xilol I, xilol II e xilol III) com trocas a cada 40 minutos e incluídos em parafina (Alquímica).

Secções de 6 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 - LEICA), utilizando-se navalhas de aço. Foram obtidas 32 secções histológicas de cada animal.

2.5.3 MORFOMETRIA DA ARTÉRIA

Foi feito o estudo morfométrico para quantificar nos cortes histológicos das artérias as medidas das áreas da placa de ateroma formada no vaso.

As análises foram realizadas utilizando o programa de análises de imagens *Image Pro Plus 4.0* (Media Cybernetics) com as calibrações ajustadas para os diferentes aumentos.

2.5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL

As preparações histológicas foram desparafinizadas e hidratadas. Os cortes foram lavados em tampão PBS 0,1M por 5 minutos. Sobre os cortes, foram adicionados aproximadamente 30 µL do anticorpo primário antióxido nítrico sintase endotelial (p-NOS3) na diluição de 1:100 (IgG policlonal de cabra; sc-12972, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 20 horas, em câmara úmida sob refrigeração (4°C). Nos cortes controle, foi adicionado PBS em substituição ao anticorpo primário. As secções foram novamente lavadas com tampão e o anticorpo secundário conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) na mesma diluição (IgG de jumento anti-cabra; sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) , foi adicionado aos cortes sob as mesmas condições anteriores. Os cortes foram novamente lavados em tampão e montados com lamínulas com meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para coloração dos núcleos (Ultra Cruz Mounting Medium, sc-24941 Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Os cortes foram analisados e fotografados em microscópio de epifluorescência (BX-60, Olympus), com câmera digital acoplada (Q-Color 3, Olympus). Foram utilizados filtros WB e WU para observação da fluorescência do FITC e do DAPI, respectivamente.

A intensidade da reação foi inferida pelo uso das mesmas condições de luminosidade e de obtenção das imagens com o aplicativo Q-Capture (Olympus). Com o uso do filtro WB, utilizou-se o tempo de captura de 1,92 s (segundos) e com o WB, 23,2 ms (1/1000 segundos). Os escores utilizados para as reações de detecção da enzima foram: muito forte = (+++); forte = (++); fraca = (+); muito fraca (+/-); e negativa (Ø)

Após análise da fluorescência para o FITC, algumas imagens foram superpostas com auxílio do programa Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics).

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi montado num esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os grupos e nas subparcelas os tempos no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados foram analisados baseados na análise de variância e de regressão. Para comparar a média da testemunha ou padrão com as demais, foi utilizado o teste de Dunnett, adotando-se o nível de 5% de probabilidade, e para comparar as médias dos grupos, foi utilizado o teste de TUKEY ao nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo, foi utilizada a análise de regressão, e os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão, utilizando o teste t, adotando o nível de 5% de probabilidade no coeficiente de determinação e no fenômeno biológico. Independentemente de a interação ser ou não significativa, optou-se pelo seu desdobramento pelo interesse em estudo. Foi utilizado o programa computacional Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PESO DOS ANIMAIS ESTUDADOS

A Tabela 1 mostra o peso corporal médio dos animais estudados. Nos tempos de 25 e de 50 dias, o peso corporal dos grupos estudados não foi diferente significativamente do peso dos animais no tempo zero, pelo teste de Dunnett, indicando que o peso corporal dos animais não variou no período de estudo (Tabela 1). Portanto, a dieta à qual os animais foram submetidos não contribuiu com o ganho ou perda de peso

no período do estudo experimental (Tabela 1A), o que poderia complicar na interpretação dos resultados.

Nos tempos de 25 e 50 dias, o peso corporal do grupo que recebeu estatina foi menor ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle negativo (Grupo I) e ao grupo que recebeu resveratrol (Grupo IV) (Tabela 1). Este resultado não refletiu uma perda de peso no grupo III, pois o peso deste grupo não foi diferente significativamente do tempo zero nos tempos 25 e 50.

Tabela 1. Peso corporal médio (g) dos coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	3058 ^a	3130 ^a	3148 ^a
Grupo II	2862 ^a	2873 ^{ab}	2869 ^{ab}
Grupo III	2792 ^a	2697 ^b	2654 ^b
Grupo IV	3176 ^a	3232 ^a	3151 ^a
Grupo V	2991 ^a	2922 ^{ab}	2910 ^{ab}
Grupo VI	2922 ^a	2890 ^{ab}	2888 ^{ab}
Grupo VII	2912 ^a	2905 ^{ab}	2999 ^{ab}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

3.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS NAS FUNÇÕES RENAIAS

3.2.1 PROTEÍNAS TOTAIS

As Tabelas 2, 3 e 4 mostram as médias das concentrações plasmáticas de proteínas totais, albumina e creatinina avaliadas em coelhos nos tempos zero, 25 e 50.

Tabela 2. Valores médios da concentração de proteínas totais (g/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	73,70 ^a	85,70 ^d	74,56 ^b
Grupo II	77,30 ^a	295,30 ^{ab*}	214,60 ^{a*}
Grupo III	86,90 ^a	147,10 ^{cd}	69,80 ^b
Grupo IV	80,10 ^a	338,60 ^{a*}	108,40 ^b
Grupo V	83,90 ^a	255,80 ^{ab*}	256,60 ^{a*}
Grupo VI	78,00 ^a	234,00 ^{bc*}	235,80 ^{a*}
Grupo VII	78,70 ^a	270,30 ^{ab*}	236,90 ^{a*}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Na Tabela 2, observa-se que os grupos II, V, VI e VII tiveram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de proteína nos tempos 25 e 50 em relação ao grupo que não recebeu colesterol (grupo I), tendo estes grupos apresentado diferença significativa (teste de Dunnett) nos tempos 25 e 50 do tempo zero.

O grupo III teve o nível de proteína plasmática significativamente menor que o grupo II nos tempos 25 e 50, mas não foi diferente do grupo I. O grupo III não variou significativamente seus níveis plasmáticos de proteínas durante os tempos 25 e 50 do tempo zero (teste de Dunnett) (Tabela 2).

As concentrações plasmáticas de proteínas totais não se apresentaram diminuídas em nosso estudo, o que poderia sugerir problemas renais ou hepáticos. Também, a síntese de proteínas plasmáticas reduzida pode resultar numa diminuição do fibrinogênio plasmático, causando um aumento no tempo de protrombina e retardando o tempo de coagulação do sangue nos capilares (RIBEIRO *et al.*, 2006). Estes efeitos poderiam prejudicar a interpretação dos nossos resultados.

3.2.2 ALBUMINA

A Tabela 3 mostra o efeito da administração de sinvastatina, resveratrol, vinho tinto, vinho branco e suco de uva nos níveis de albumina plasmática nos respectivos tempos de coleta. Observa-se que todos os grupos nos tempos 25 e 50 tiveram um aumento significativo ($P \leq 0,05$) nos níveis plasmáticos de albumina em relação ao grupo controle que não recebeu colesterol (grupo I).

Os grupos II, V, VI e VII apresentaram diferença significativa (teste de Dunnett) nos tempos 25 e 50 do tempo zero para a concentração plasmática de albumina (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios da concentração de albumina (g/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	54,70 ^a	63,80 ^c	45,32 ^d
Grupo II	55,20 ^a	83,80 ^{b*}	80,40 ^{ab*}
Grupo III	63,40 ^a	83,20 ^{b*}	61,60 ^c
Grupo IV	58,10 ^a	101,20 ^{a*}	70,10 ^{bc}
Grupo V	55,80 ^a	86,40 ^{b*}	93,90 ^{a*}
Grupo VI	55,40 ^a	81,60 ^{b*}	85,10 ^{a*}
Grupo VII	56,60 ^a	90,60 ^{ab*}	85,00 ^{a*}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, perfazendo cerca de 50% do total de proteínas. É sintetizada no fígado e contribui com 80% da osmolaridade do plasma sanguíneo, constituindo, também, uma importante reserva proteica, bem como um transportador de ácidos graxos livres, aminoácidos, cálcio, hormônios e bilirrubina (ROCHE *et al.*, 2008).

Valores muito baixos de albumina fazem prever doenças graves, seja pelo aumento das perdas e/ou pelo aumento do catabolismo e diminuição da síntese de albumina. A concentração da albumina plasmática pode diminuir (hipoalbuminemia) em algumas situações como dano hepático crônico, déficit alimentar de fontes proteicas, parasitismos, síndrome da má absorção, catabolismo aumentado da albumina como consequência de déficit energético, hemorragias, doença renal (síndrome nefrótica) (SILVA *et al.*, 2008).

Na síndrome nefrótica, ocorrem alterações lipídicas que se relacionam com os níveis de albumina no plasma, sendo observados níveis muito baixos de albumina nesta síndrome, o que provoca a inibição da lipólise, sendo um estímulo para o aumento da síntese hepática de lipoproteínas. Isso leva a uma maior síntese de VLDL e LDL, causando, por consequência, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, respectivamente (KRONENBERG, 2005).

Em nosso estudo, não foram observados baixos níveis de albumina no plasma dos coelhos estudados, portanto, a dieta aterogênica e os tratamentos não ocasionaram danos ao organismo desses animais que pudessem provocar alterações metabólicas que iriam interferir na análise dos resultados.

3.2.3 CREATININA

Aos 25 dias de estudo, os respectivos tratamentos não alteraram os níveis plasmáticos de creatinina. No tempo 50, o grupo tratado com estatina (grupo III) apresentou índices plasmáticos aumentados ($P \leq 0,05$) em relação aos grupos tratados com resveratrol (grupo IV), sinvastatina (grupo V) e suco de uva (grupo VII). O grupo III também apresentou níveis mais altos ($P \leq 0,05$) no tempo de 50 dias em relação ao tempo zero (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios da concentração de creatinina (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	1,11 ^a	1,13 ^a	1,33 ^{ab}
Grupo II	1,10 ^a	1,21 ^a	0,97 ^{ab}
Grupo III	0,95 ^a	1,12 ^a	2,45 ^{a*}
Grupo IV	1,15 ^a	0,97 ^a	0,78 ^b
Grupo V	1,14 ^a	0,84 ^a	0,59 ^b
Grupo VI	1,00 ^a	0,88 ^a	1,06 ^{ab}
Grupo VII	1,05 ^a	0,83 ^a	0,89 ^b

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não proteico, formado pela desidratação da creatina, encontrada no sangue e na urina, sendo utilizada na avaliação inicial da função renal na prática clínica diária. A creatinina plasmática não é marcadamente influenciada pela dieta ou por hemorragias intestinais. Uma severa perda muscular poderá reduzir a quantidade de creatinina formada. Uma redução na taxa de filtração glomerular aumenta a concentração sérica de creatinina (MIZOI *et al.*, 2008).

Foi observado em nosso estudo que o grupo III apresentou maior concentração plasmática de creatinina em relação aos grupos IV, V e VII, mas não apresentou diferença estatística do grupo I. Portanto, estes valores aumentados na concentração plasmática de creatinina no grupo III não indicaram problemas na função renal.

3.3 EFEITO DOS TRATAMENTOS NOS NÍVEIS DOS LIPÍDIOS PLASMÁTICOS

3.3.1 COLESTEROL TOTAL

As Tabelas 5, 6, 7 e 8 mostram as médias das concentrações plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis, LDL colesterol e HDL colesterol analisadas em coelhos nos tempos zero, 25 e 50.

No presente estudo, todos os grupos de animais que receberam uma dieta rica em colesterol apresentaram níveis sanguíneos significativamente aumentados de colesterol total (Tabela 5), quando comparados com os níveis sanguíneos dos animais que receberam uma dieta normal sem adição de colesterol.

Tabela 5. Valores médios da concentração de colesterol total (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	71,92 ^a	68,70 ^b	52,06 ^b
Grupo II	56,99 ^a	1112,50 ^{a*}	973,90 ^{a*}
Grupo III	70,27 ^a	943,10 ^{a*}	660,00 ^{a*}
Grupo IV	89,18 ^a	1140,40 ^{a*}	829,40 ^{a*}
Grupo V	68,40 ^a	1103,80 ^{a*}	874,90 ^{a*}
Grupo VI	67,55 ^a	1166,10 ^{a*}	1090,30 ^{a*}
Grupo VII	69,90 ^a	1274,70 ^{a*}	999,60 ^{a*}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam a eficiência do acréscimo de 1% de colesterol na ração dos coelhos na indução da

hipercolesterolemia, uma vez que os níveis de colesterol total no grupo II foram aumentados acima de 15 vezes em relação ao grupo I ($p \leq 0,05$).

Não foi encontrada diferença significativa entre grupos III, IV, V e o grupo II. No entanto, os dados apresentados na Tabela 5 mostram um percentual médio menor nas concentrações plasmáticas de colesterol nos grupos III, IV e V em relação ao grupo II. Para o grupo III, houve uma redução percentual nos níveis de colesterol total de 15,23% na coleta de 25 dias e de 32,23% na coleta de 50 dias. No grupo IV, aos 50 dias, foi observada uma diminuição percentual de 14,84% nos níveis de colesterol total. Para o grupo V, a redução nos níveis de colesterol total foi de 0,78% aos 25 dias de estudo e aos 50 dias foi de 10,16% (Tabela 5).

Vários estudos relatam a eficiência da sinvastatina e do resveratrol na redução dos níveis plasmáticos de colesterol. As estatinas desde sua descoberta têm revolucionado o tratamento da hipercolesterolemia, apresentando estruturas homólogas à HMG-CoA redutase (KWAK *et al.*, 2003; MERX e WEBER, 2008). Por mecanismo de competição, inibem a atividade da HMG CoA redutase, reduzindo assim a L-mevalonato disponível e a biossíntese de colesterol (KWAK *et al.*, 2003).

Cho *et al.* (2008) investigaram o efeito hipolipemiante do resveratrol em hamster, que foi induzido à hiperlipidemia por uma dieta rica em colesterol durante 8 semanas. As concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol livre e colesterol total foram diminuídas no grupo de animais que recebeu 0,025% de resveratrol com dieta rica em gordura. Além disso, a atividade hepática da HMG-CoA redutase foi menor no grupo suplementado com resveratrol e a expressão do RNAm da HMG-CoA, indicando que o resveratrol inibe a síntese de colesterol, alterando a HMG-CoA hepática.

Em estudo desenvolvido com ratos magros e obesos, foi verificado o efeito da dose crônica de resveratrol (10mg/kg de peso dia) nas concentrações plasmáticas de colesterol. Foi observada uma diminuição de 29,7% do colesterol total no grupo dos ratos obesos. No entanto, no grupo dos ratos magros, não foi encontrada diferença significativa entre os ratos que receberam resveratrol e seus controles (RIVERA *et al.*, 2009).

Para verificar o efeito do resveratrol e da estatina em ratos hipercolesterolêmicos, Penumathsa *et al.* (2007) administraram uma dieta com 2% de colesterol por 8 semanas e depois trataram os animais com resveratrol (20mg/kg peso/dia) e pravastatina (1mg/kg peso/dia) por 2 semanas. Os ratos tratados com resveratrol tiveram uma diminuição significativa de colesterol, triglicerídeos e LDL-c quando comparados com o grupo controle, mas a redução dos grupos tratados com estatina e resveratrol+estatina foi mais acentuada.

O consumo moderado de vinho tinto está associado a um risco reduzido de doença arterial coronariana (DAC). Este fenômeno é baseado em dados de observações epidemiológicas conhecidos como o paradoxo francês e tem sido atribuído aos polifenóis presentes no vinho tinto. Poucos estudos, no entanto, relatam a eficiência do vinho tinto na redução significativa do colesterol plasmático, mas existem relatos como no estudo realizado por Vinson *et al.* (2001) em que o vinho tinto desalcoholizado, ingerido na dose de 12mL/dia por 4 semanas, reduziu significativamente os níveis plasmáticos de colesterol e LDL em *hamsters*.

3.3.2 TRIACILGLICERÓIS

A Tabela 6 mostra os resultados dos níveis plasmáticos de triacilglicerol. No período de 25 dias, todos os grupos estudados apresentaram diferença significativa em relação ao grupo I. Na coleta de 50 dias, o Grupo VII apresentou níveis de triacilglicerol aumentados em relação aos grupos I e IV. O grupo tratado com resveratrol foi mais eficiente na redução da concentração plasmática de triacilglicerol do que o grupo tratado com suco de uva.

Tabela 6. Valores médios da concentração de triacilglicerol (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	148,14 ^a	201,74 ^b	54,02 ^b
Grupo II	87,08 ^a	64,15 ^a	64,40 ^{ab}
Grupo III	133,86 ^a	66,41 ^a	95,11 ^{ab}
Grupo IV	87,54 ^a	64,10 ^a	53,73 ^b
Grupo V	139,28 ^a	68,70 ^a	75,94 ^{ab}
Grupo VI	181,32 ^a	82,33 ^{a*}	85,58 ^{ab}
Grupo VII	158,62 ^a	83,41 ^a	172,97 ^a

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Os níveis plasmáticos de triacilglicerol, para cada grupo estudado, não variaram com o período de tempo do estudo (Apêndice A - Tabela 6A).

Estes resultados corroboram os resultados de outros estudos. Em estudo de Wang *et al.* (2005), desenvolvido em coelhos alimentados por 12 semanas com uma dieta que continha 1,5% de colesterol, tratados com resveratrol e vinho tinto desalcoholizado, respectivamente, foi observado aumento significativo nos níveis plasmáticos de HDL e LDL-colesterol, mas não de triacilgliceróis, em comparação com aqueles alimentados com uma dieta regular.

3.3.3 LDL colesterol

No período de 25 dias de estudo, todos os grupos tiveram os níveis plasmáticos de LDL colesterol aumentados ($P \leq 0,05$) em relação ao grupo I. Na coleta de 50 dias, os grupos II, V, VI e VII tiveram os níveis plasmáticos de LDL colesterol aumentados ($P \leq 0,05$) em relação ao grupo I. Na coleta de 25 e 50 dias, todos os grupos, com exceção do grupo I,

foram diferentes significativamente, pelo teste de Dunnett, da coleta zero (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios da concentração de LDL colesterol (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	31,78 ^a	40,62 ^b	22,94 ^b
Grupo II	29,79 ^a	377,50 ^{a*}	320,80 ^{a*}
Grupo III	39,55 ^a	496,50 ^{a*}	178,20 ^{ab*}
Grupo IV	45,38 ^a	394,00 ^{a*}	196,70 ^{ab*}
Grupo V	33,70 ^a	388,20 ^{a*}	270,90 ^{a*}
Grupo VI	34,63 ^a	467,20 ^{a*}	331,50 ^{a*}
Grupo VII	36,66 ^a	378,40 ^{a*}	346,00 ^{a*}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Na coleta de 50 dias, os grupos III e IV não foram significativamente diferentes do grupo I, mas se considerarmos os valores médios da concentração plasmática de LDL colesterol dos grupos III e IV em relação ao grupo II, pode-se observar uma redução percentual nos níveis de LDL de 44,45% e 38,68%, respectivamente (Tabela 7).

As estatinas diminuem a concentração do colesterol hepático, e esta diminuição estimula um mecanismo de compensação, ocorrendo aumento da expressão de receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na superfície dos hepatócitos, resultando em aumento da remoção de LDL do sangue e sua redução plasmática (KWAK *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2005).

ROCHA *et al.* (2009) demonstraram, em estudo conduzido com ratos *Wistar*, que os grupos que receberam ração padrão mais resveratrol (1mg/kg peso/dia) por 45 dias e ração com alto teor de gordura mais resveratrol (1mg/kg peso/dia) por 15 dias tiveram redução na LDL oxidada quando comparados aos grupos controle de ração com baixo teor de gordura e alto teor de gordura.

3.3.4 HDL colesterol

No período experimental de 25 dias, foi observado que a maioria dos grupos foram diferentes significativamente do Grupo I, exceto o grupo VI, que também não apresentou diferença significativa para o tempo zero (teste de Dunnett). Este grupo teve o menor valor para o HDL, mas na coleta de 50 dias, houve diferença significativa em relação à coleta zero (teste de Dunnett), observando-se um aumento nos níveis de HDL. Na coleta de 50 dias, os grupos II, III, V, e VI apresentaram diferença significativa do grupo I, indicando valores aumentados de HDL para estes grupos, sendo que o grupo V teve um aumento de 112,31% nos níveis de HDL. Os grupos II, III, V, VI e VII no período de 50 dias tiveram concentrações plasmáticas aumentadas ($p \leq 0,05$) de HDL em relação ao tempo zero (teste de Dunnett) (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios da concentração de HDL colesterol (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	16,16 ^a	12,74 ^b	24,36 ^c
Grupo II	11,90 ^a	33,79 ^{a*}	45,81 ^{ab*}
Grupo III	13,09 ^a	38,02 ^{a*}	46,63 ^{ab*}
Grupo IV	25,42 ^a	39,73 ^{a*}	34,65 ^{bc}
Grupo V	16,50 ^a	38,93 ^{a*}	51,72 ^{a*}
Grupo VI	12,92 ^a	24,37 ^{ab}	44,06 ^{ab*}
Grupo VII	20,94 ^a	38,88 ^{a*}	38,08 ^{abc*}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

As HDL são responsáveis pelo transporte reverso de colesterol, transportando o excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos de volta para o fígado. Após sua formação, são captadas pelo fígado pelos receptores SRB1(*scavenger receptors B, class 1*) e pelos receptores apo

E (também existentes na adrenal e no ovário) (SCHIAVO *et al.*, 2003; FORTI e DIAMENT, 2006).

Em estudo de intervenção realizado por Leighton e Urquiara (2007), 44 jovens saudáveis do sexo masculino foram divididos em grupos que receberam uma dieta rica em gorduras e refrigerante, 250mL de vinho branco, 250mL de vinho tinto, frutas e vegetais por três semanas. Foi observado aumento na concentração de HDL de 4% a 18% entre os jovens que consumiram vinho tinto e vinho branco.

Vinson *et al.* (2001) verificou em estudo que o grupo de hamsters que recebeu suco de uva por 4 semanas aumentou significativamente o HDL quando comparado com os grupos que receberam vinho tinto ou vinho tinto desalcoholizado. Em nosso estudo não foi observada diferença significativa na concentração plasmática de HDL para os grupos que receberam vinho tinto, vinho branco ou suco de uva nos tempos estudados.

3.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS NO DESENVOLVIMENTO DA ARTEROSCLEROSE

Para identificação inicial da formação de gordura nas artérias, elas foram seccionadas longitudinalmente para expor a camada íntima e coradas com Sudan IV, um corante solúvel em gorduras (TOLOSA *et al.*, 2003). Após esta avaliação preliminar, foram feitos cortes sobre os pontos que apresentavam maior acúmulo de gordura para a realização das análises histológicas.

A avaliação da placa de gordura *en face* da aorta dos coelhos estudados revelou que o grupo controle negativo, grupo I, não apresentou acúmulo lipídico (Figura 1-I), entretanto, todos os grupos que receberam dieta com 1% de colesterol durante o período experimental apresentaram acúmulo lipídico (Figuras 1-II, III, IV, V, VI e VII).

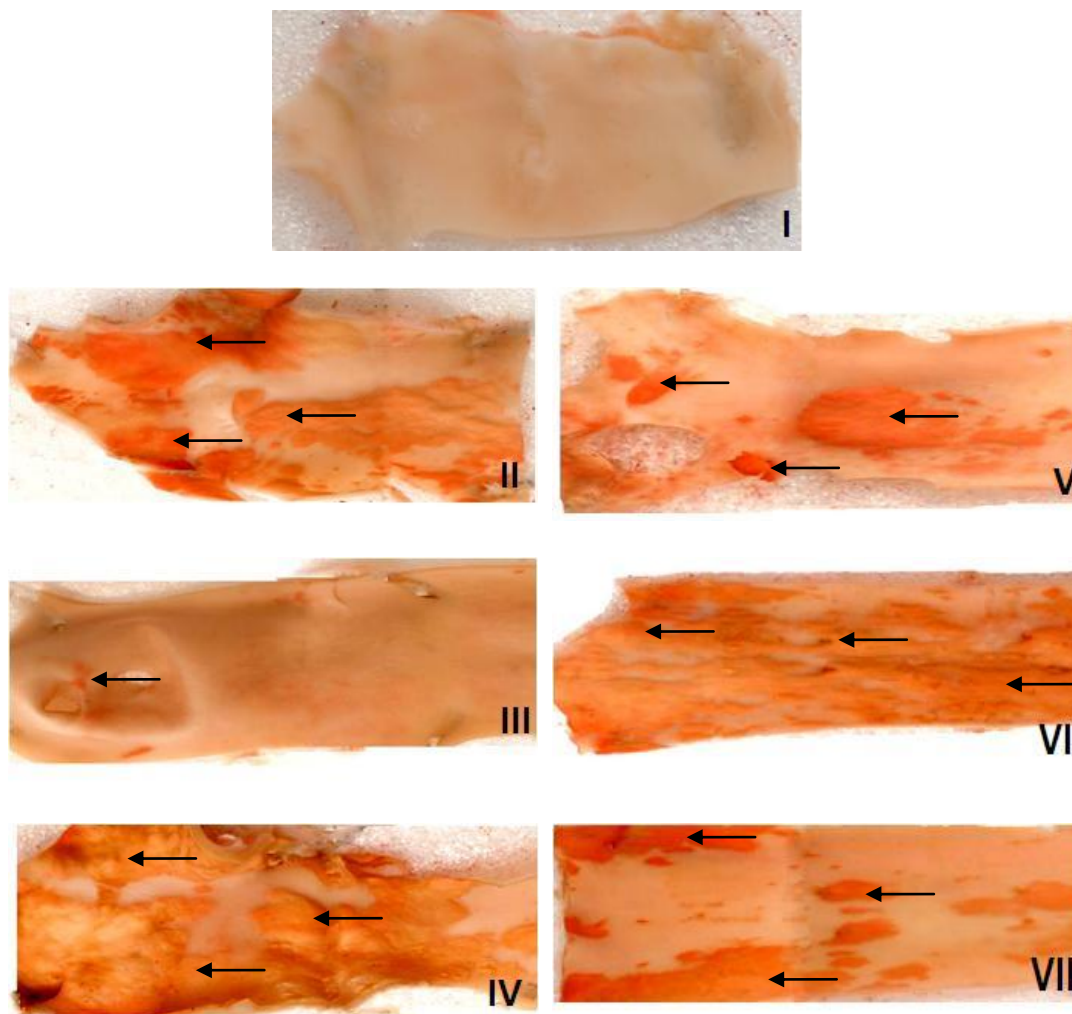


Figura 1: Artérias “en face” coradas com Sudan IV. As setas indicam as placas de gordura.

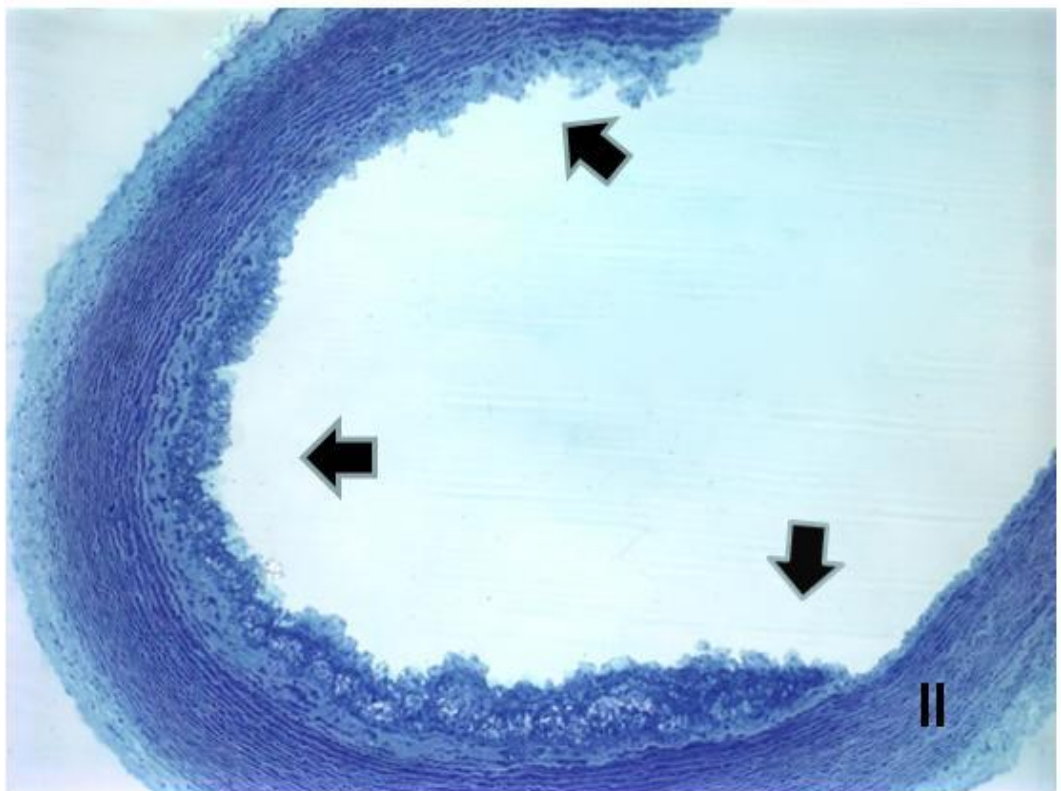
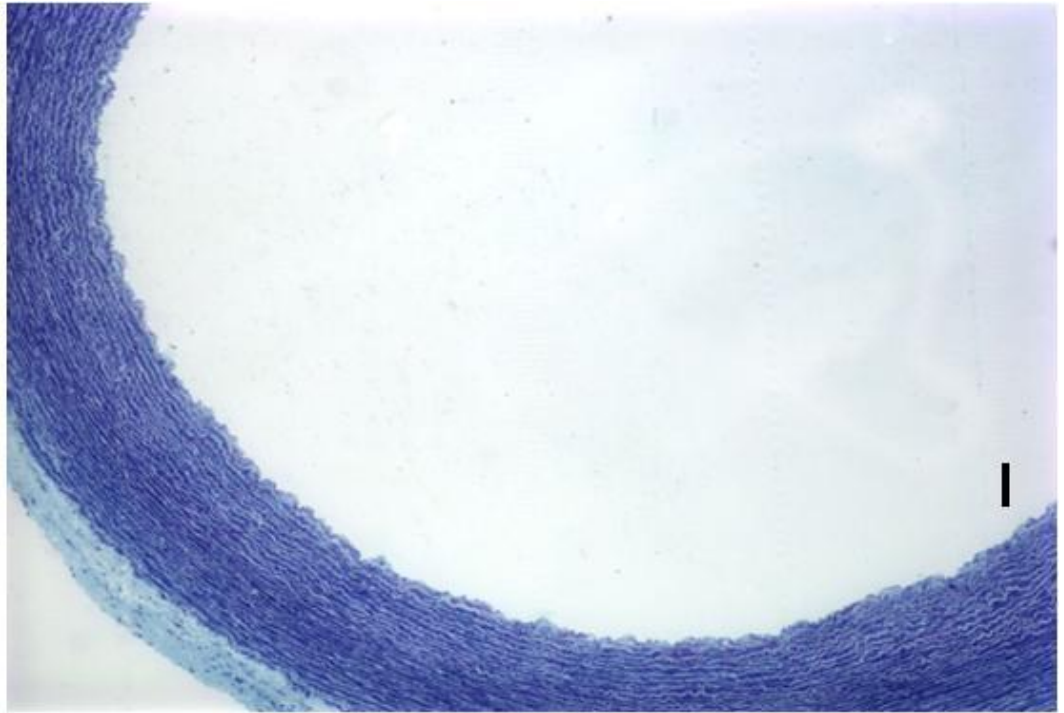
Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

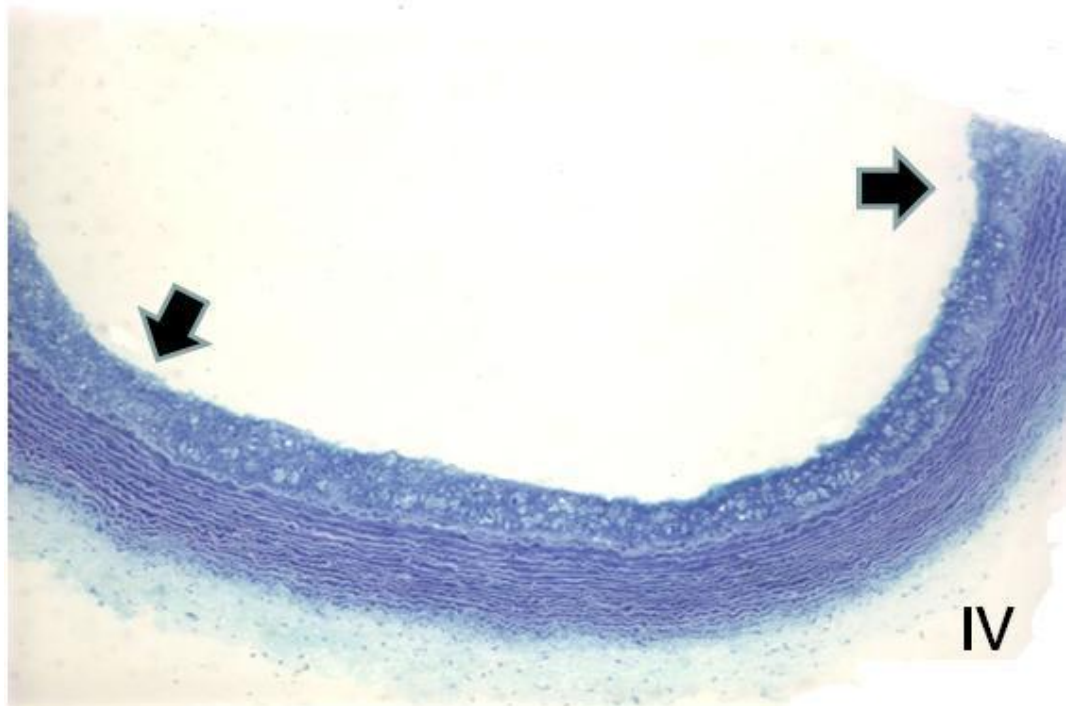
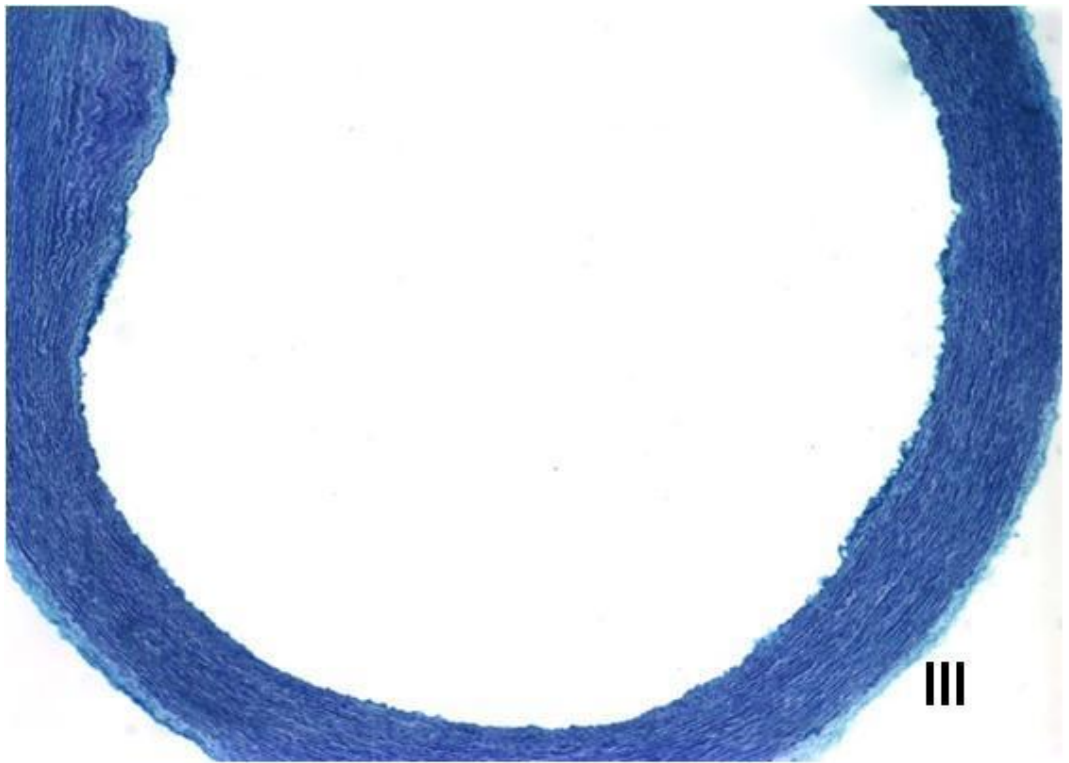
A arquitetura geral e a composição celular dos vasos sanguíneos são as mesmas em todo o sistema cardiovascular. Todavia, diferentes necessidades funcionais resultam em formas diferenciadas de especialização vascular. As artérias podem ser divididas de acordo com a estrutura e tamanho em três tipos básicos: artérias grandes ou elásticas, que incluem a aorta e seus grandes ramos; artérias de médio calibre ou artérias musculares; e artérias pequenas e arteríolas (KUMAR *et al.*, 2008).

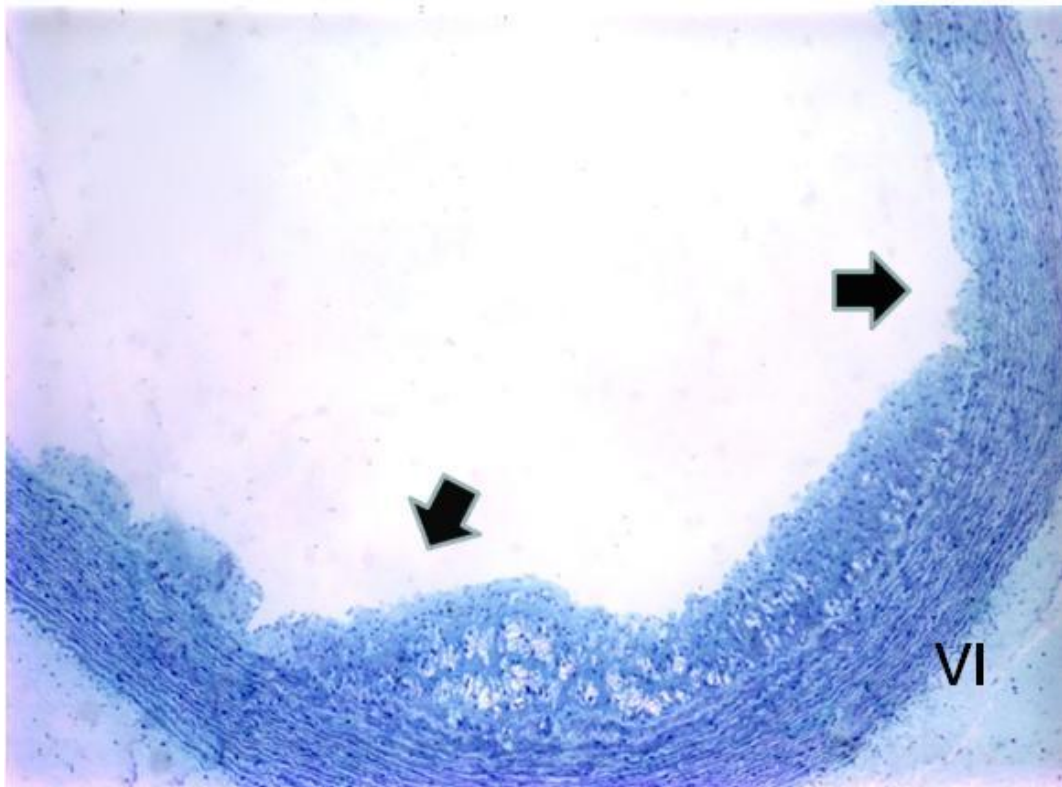
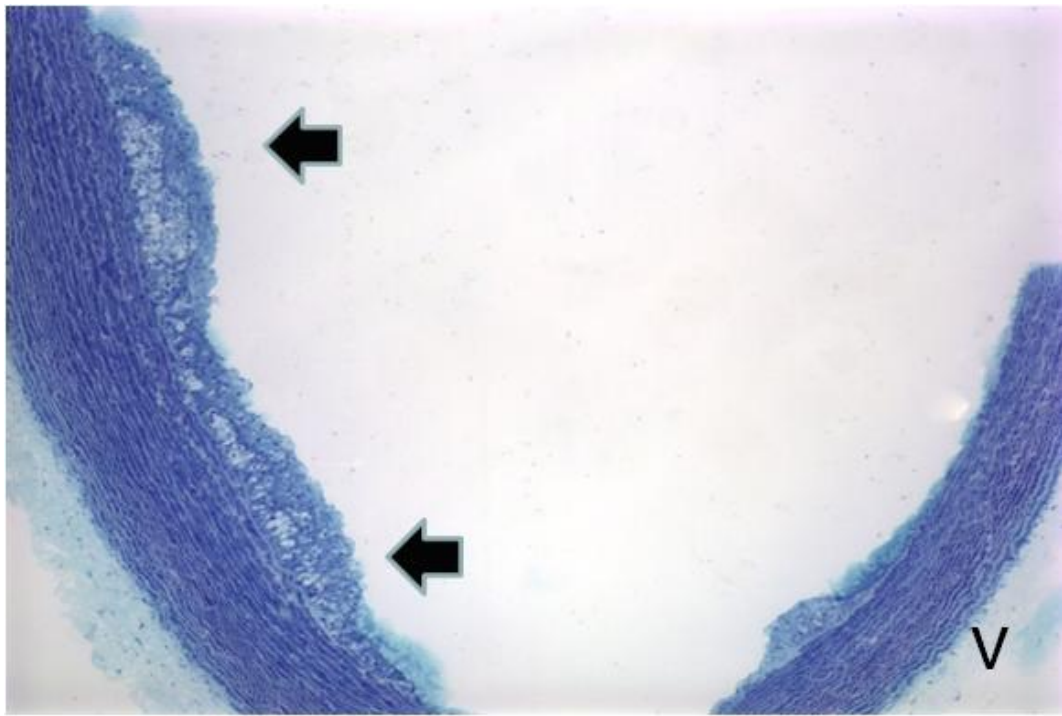
Em nosso estudo, analisamos a aorta torácica, e esta escolha foi feita pelo fato de esta artéria, pela sua diferenciação celular, desenvolver lesões patológicas da aterosclerose (KUMAR *et al.*, 2008). A Figura 2 mostra os cortes histológicos das artérias dos coelhos estudados. Foi observado que o grupo I não teve a formação de placas de gordura na camada íntima da artéria dos animais estudados, enquanto os outros grupos (Figura 2 – II, III, IV, V, VI e VII) apresentaram placas de gordura na camada íntima da artéria dos animais estudados.

A Tabela 9 mostra os resultados da área das placas de gorduras na camada íntima da artéria dos animais estudados. O grupo I não apresentou área de placas ateromatosas. O grupo III, que recebeu 10 mg de sinvastatina, teve a menor área ($0,0163 \text{ mm}^2$) ocupada na camada íntima da artéria pela formação de células espumosas em relação aos grupos IV, V, VI e VII.

Estatinas lipofílicas, como a sinvastatina, têm maior capacidade de penetrar nas células endoteliais por difusão passiva, e estas diferenças na permeabilidade tecidual e no metabolismo das estatinas podem influenciar em seus efeitos (LIAO e LAUFS, 2005). Recentemente, têm sido demonstrados os efeitos pleiotrópicos das estatinas, que incluem melhora da função endotelial, redução do estresse oxidativo, redução da adesão plaquetária e estabilização da placa de aterosclerose (JORGE *et al.*, 2005; LUDMAN *et al.*, 2009).







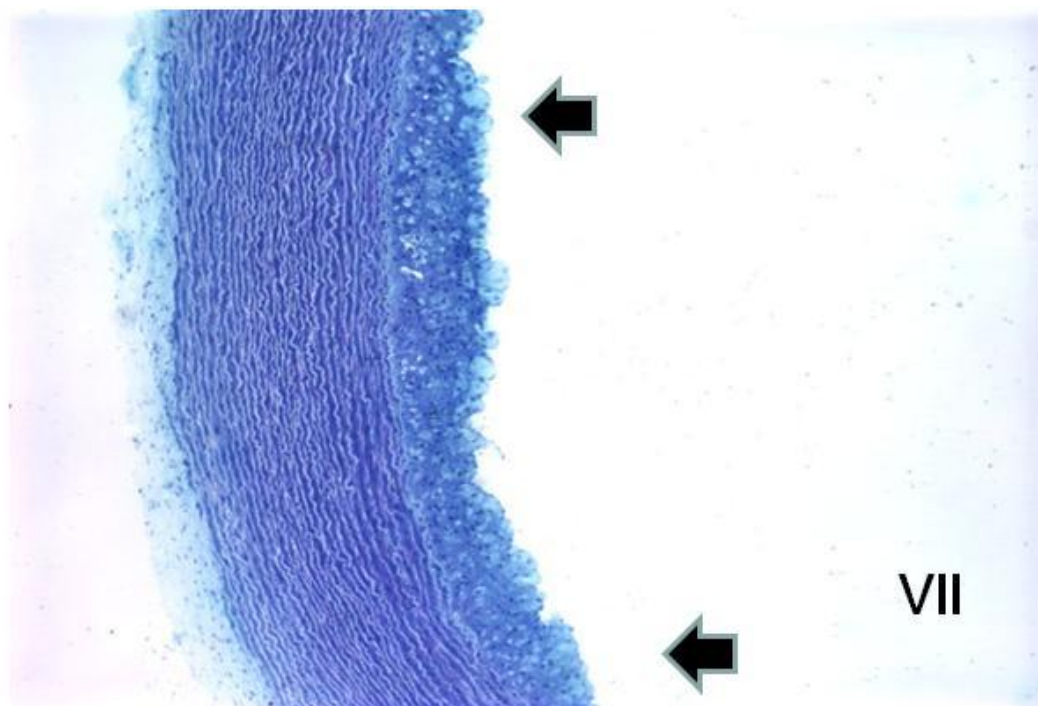


Figura 2. Análises histológicas das lesões arteriosclerótica nas artérias dos coelhos. As setas indicam a área da lesão arteriosclerótica. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Nosso resultado mostrou que a sinvastatina não reduziu significativamente os níveis plasmáticos de colesterol total (Tabela 5), entretanto, foi observada redução na formação da placa de gordura, resultado confirmado pela avaliação da área de gordura (Tabela 9) onde houve uma redução significativa na área da placa de gordura do grupo que recebeu sinvastatina.

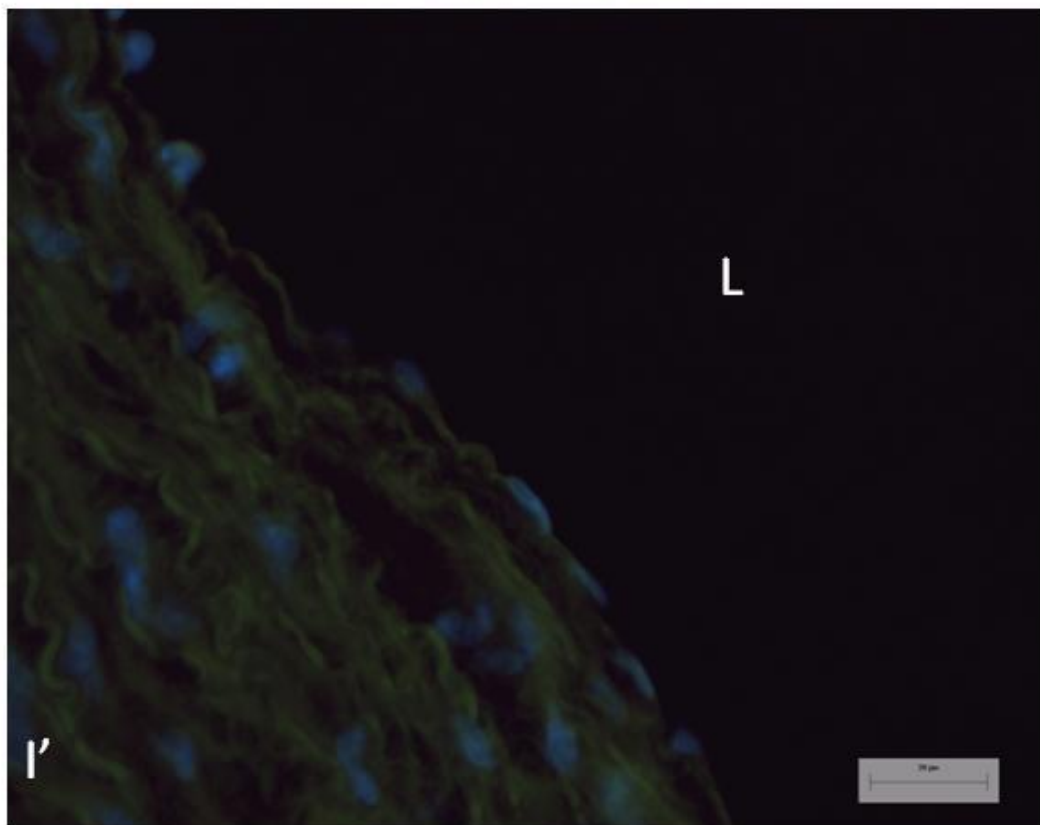
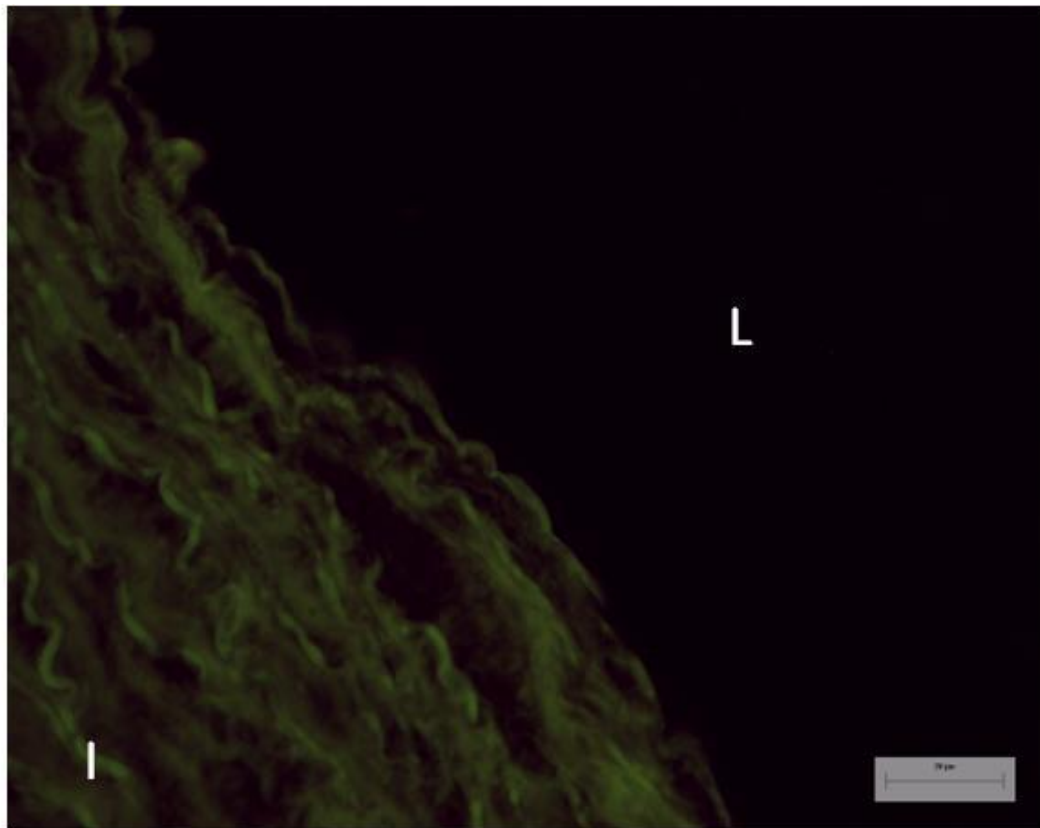
Tabela 9. Avaliação da área da lesão arterosclerótica

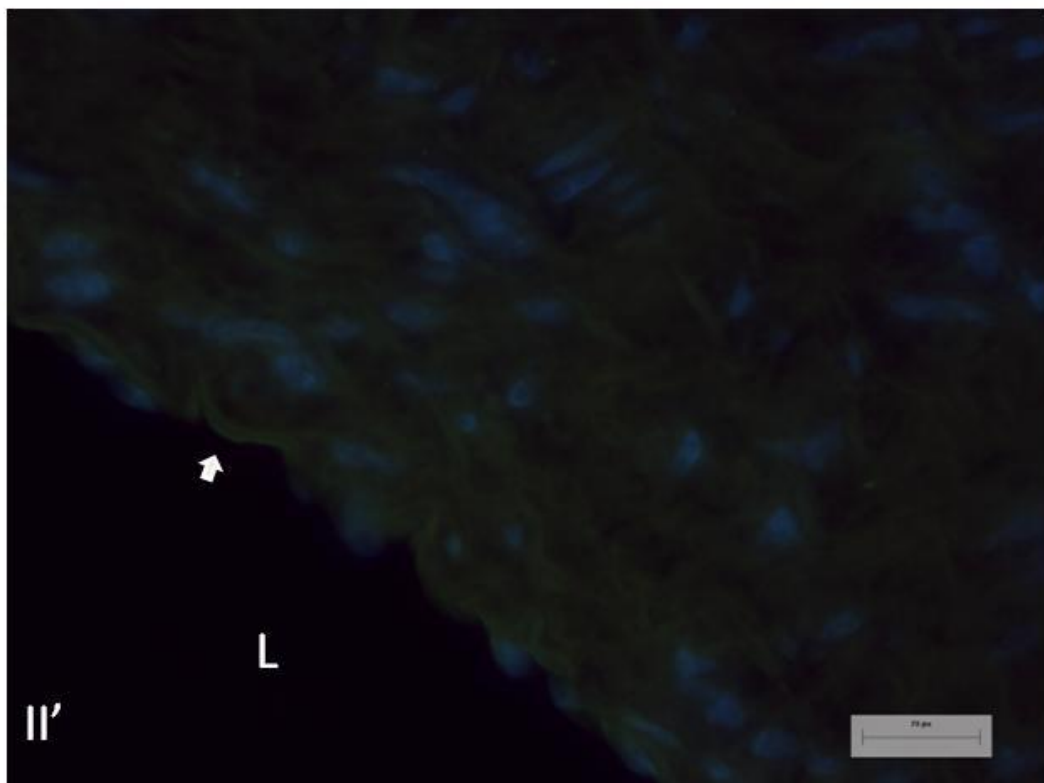
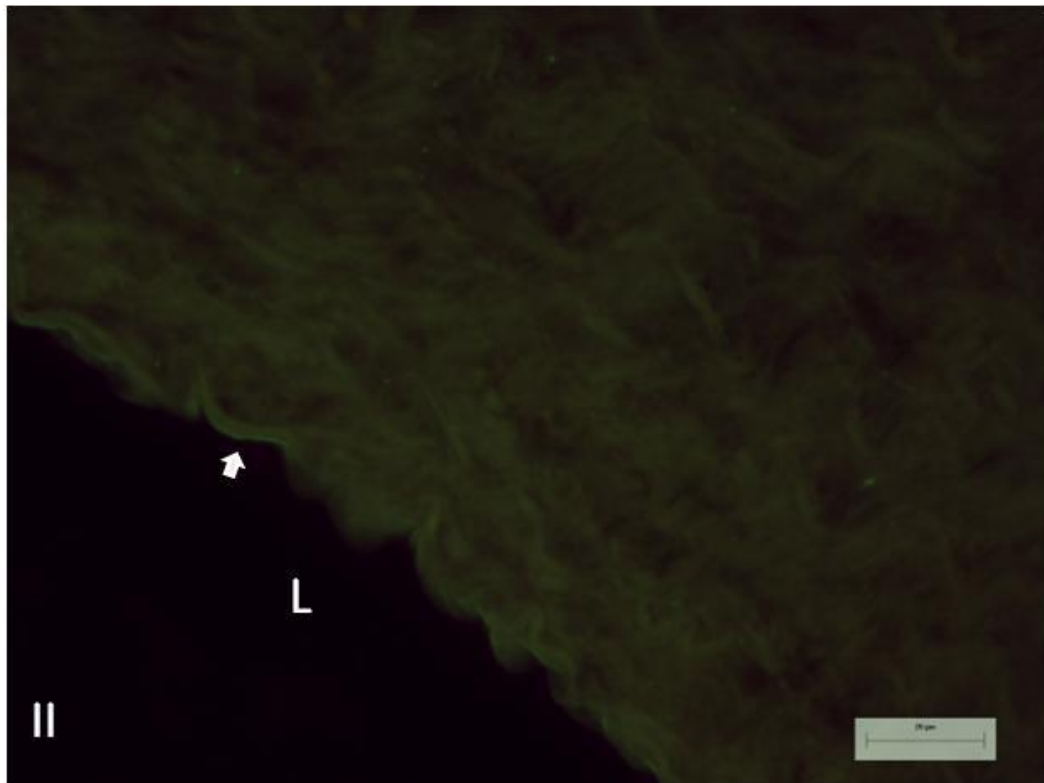
Grupos Estudados	Área da Lesão Arterosclerótica (mm ²)
Grupo I	0,0
Grupo II	0,2004 ^a
Grupo III	0,0163 ^b
Grupo IV	0,1016 ^a
Grupo V	0,0895 ^a
Grupo VI	0,2284 ^a
Grupo VII	0,1223 ^a

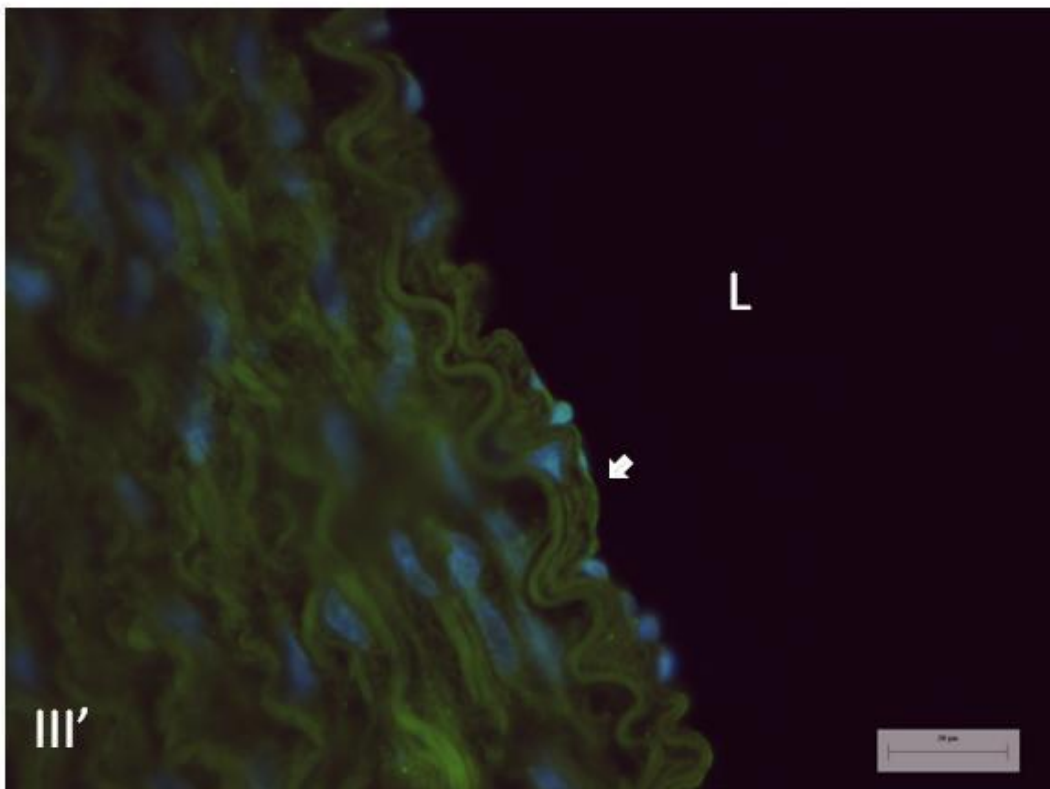
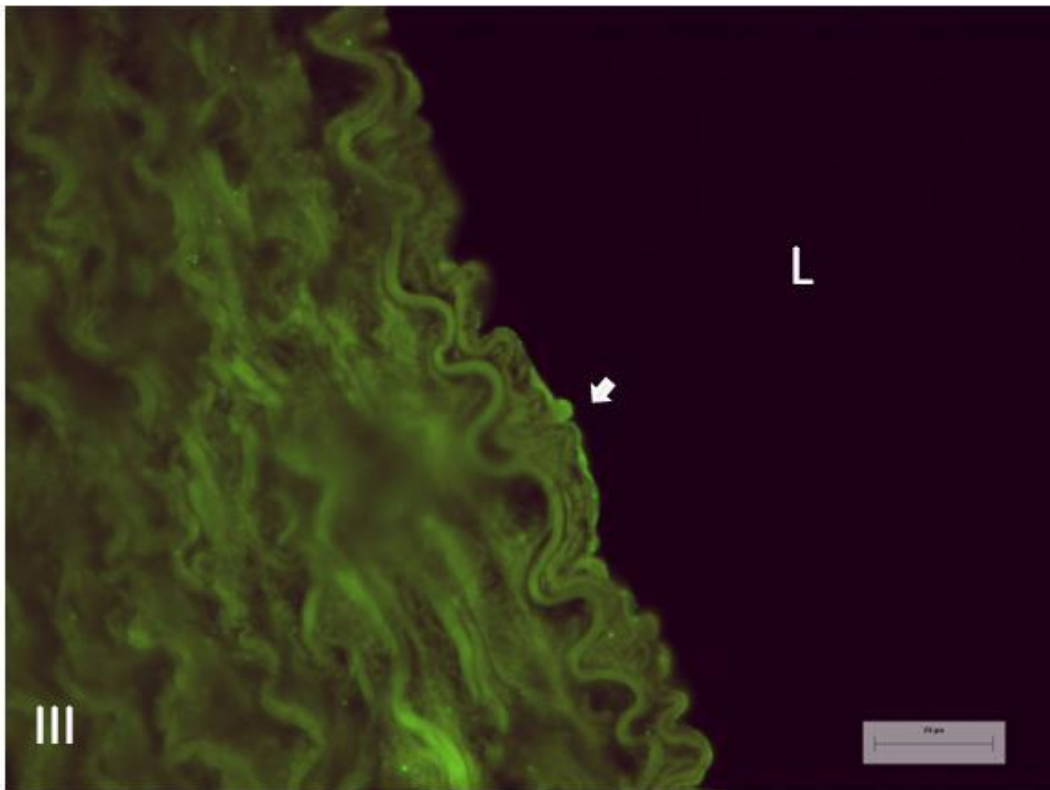
Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

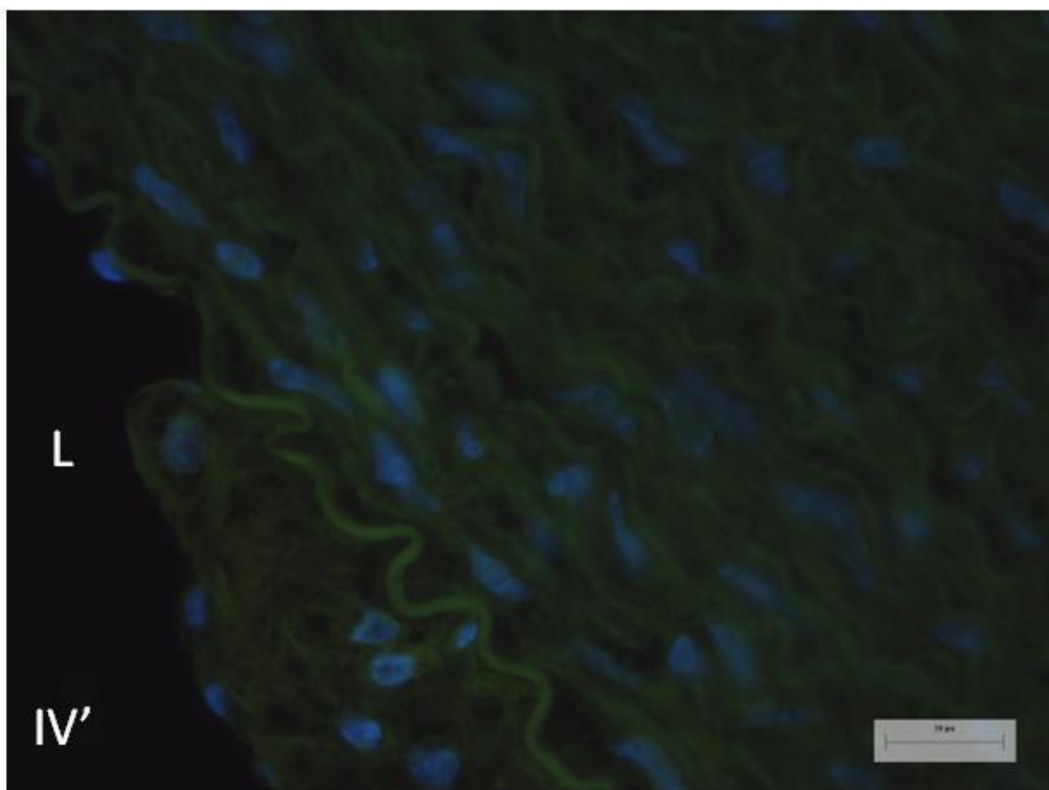
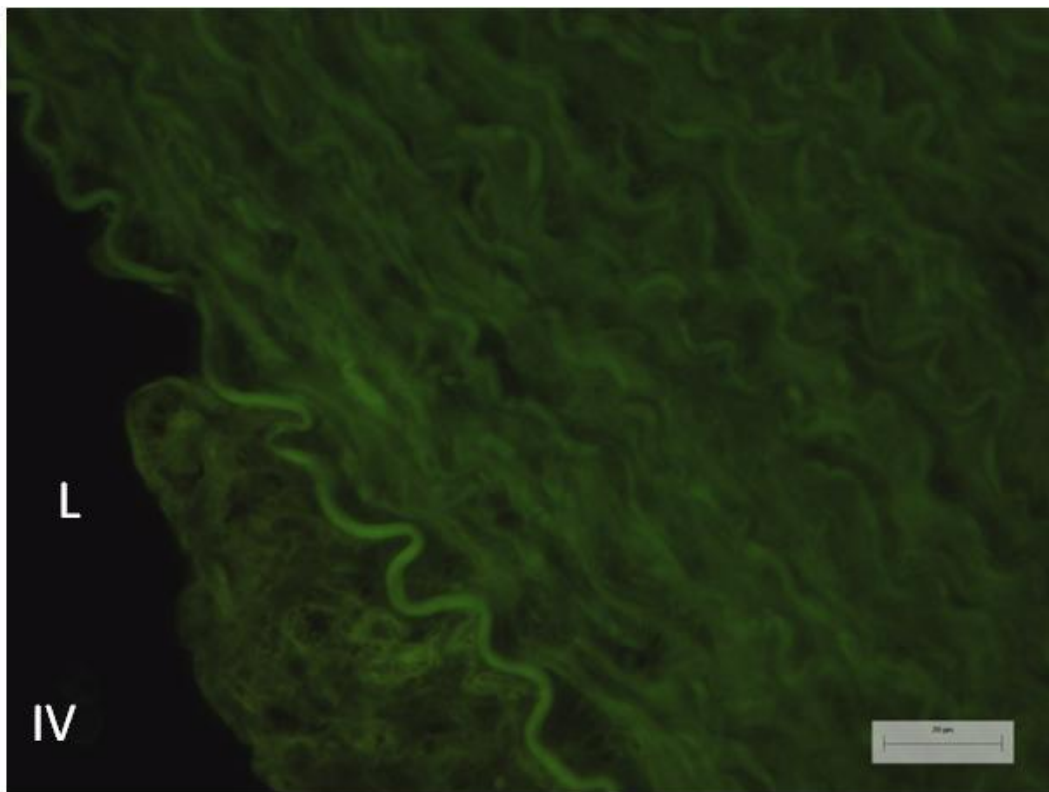
Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

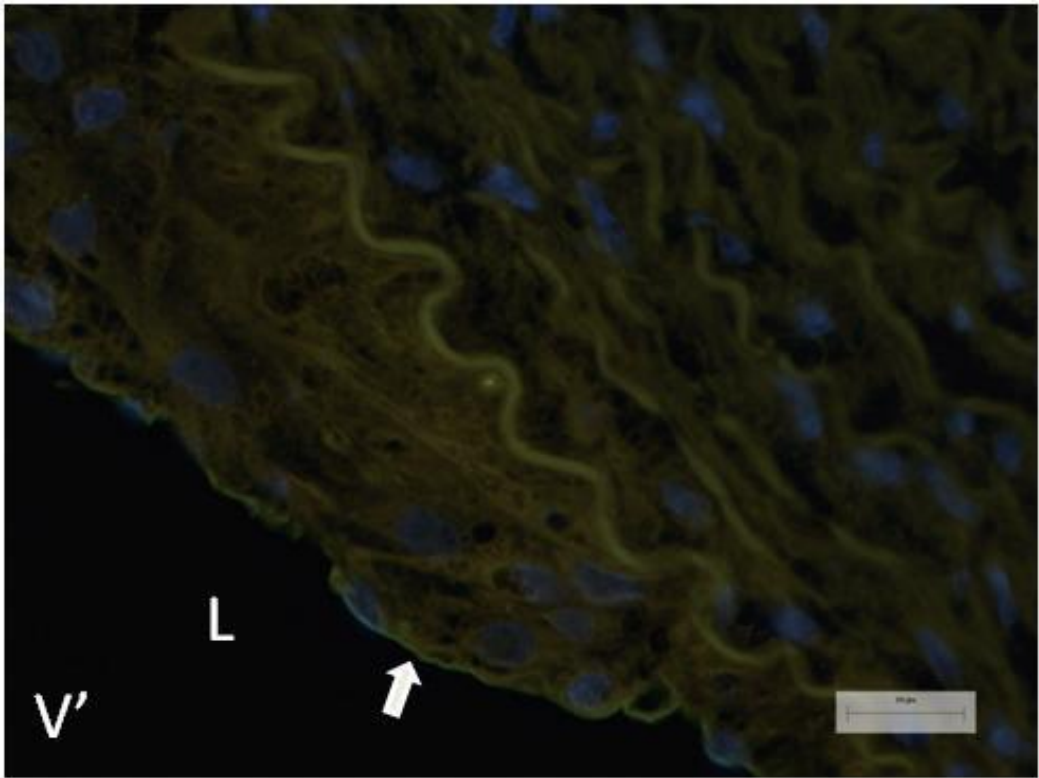
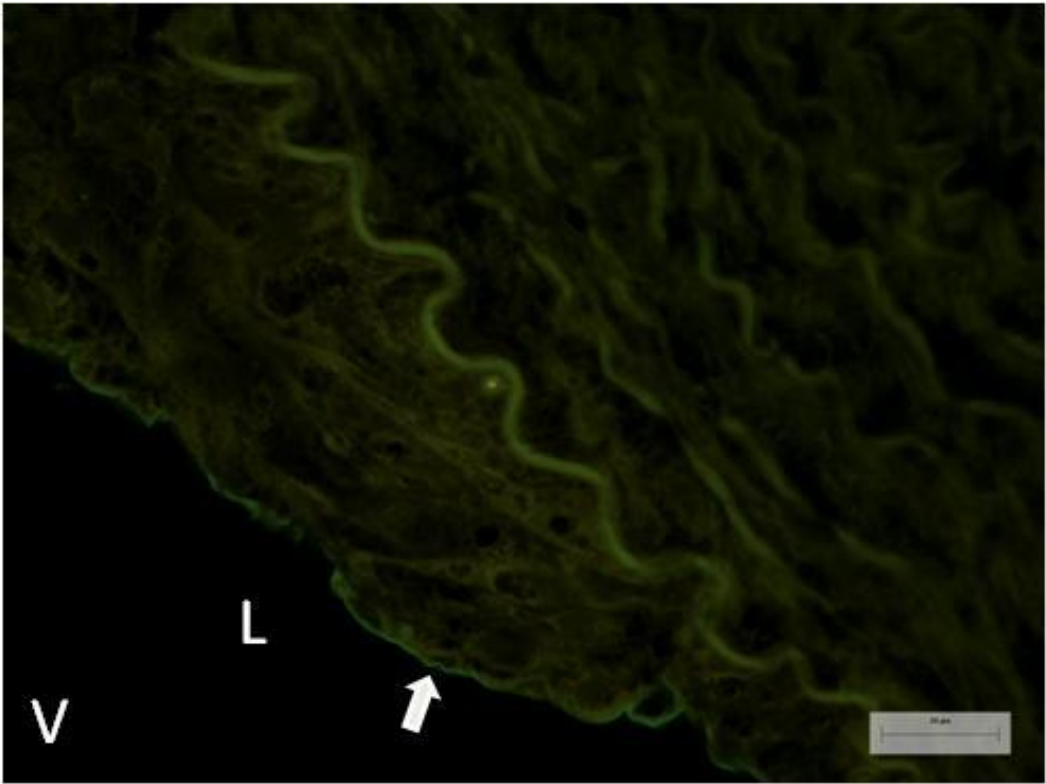
A Figura 3 mostra os resultados da expressão da enzima óxido nítrico sintase na parede arterial de coelhos. Nas Figuras 3-I e 3-VII, não foi observada a expressão da NOS, nas demais figuras, observamos a expressão da óxido nítrico sintase. No grupo II, houve uma forte expressão da enzima NOS; no grupo III, a expressão foi fraca; no grupo IV, houve uma expressão muito fraca; e nos grupos V e VI, a expressão foi muito forte (Figura 3 e Tabela 10).

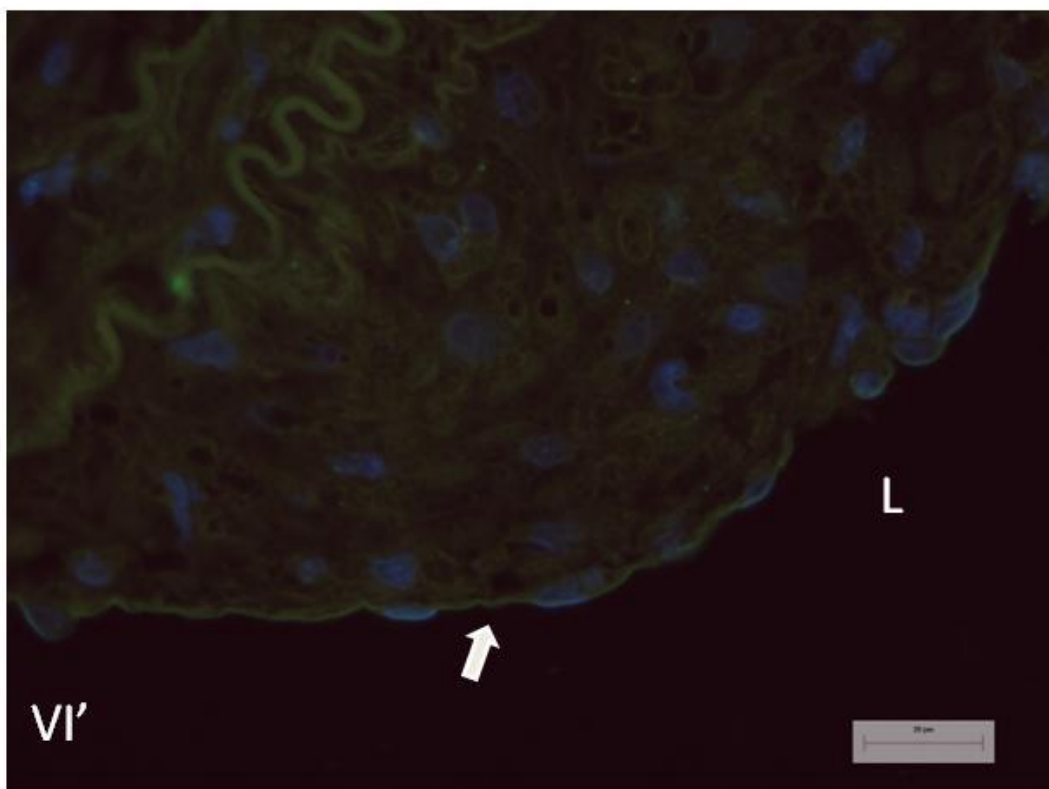
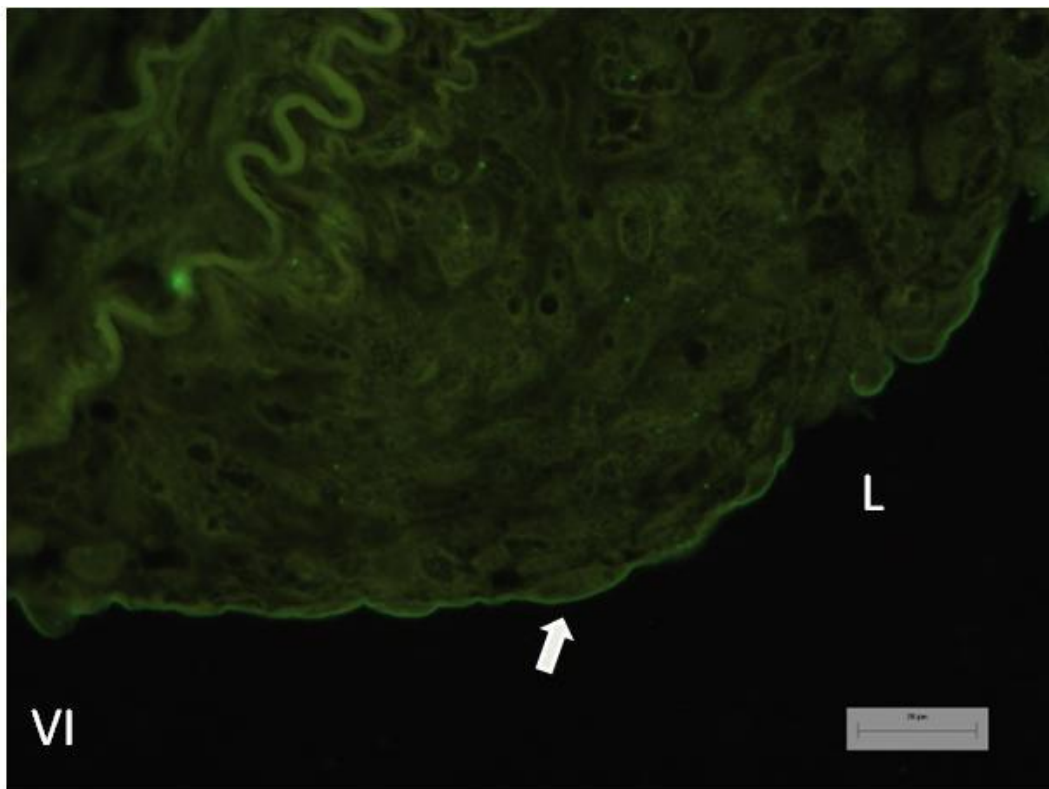












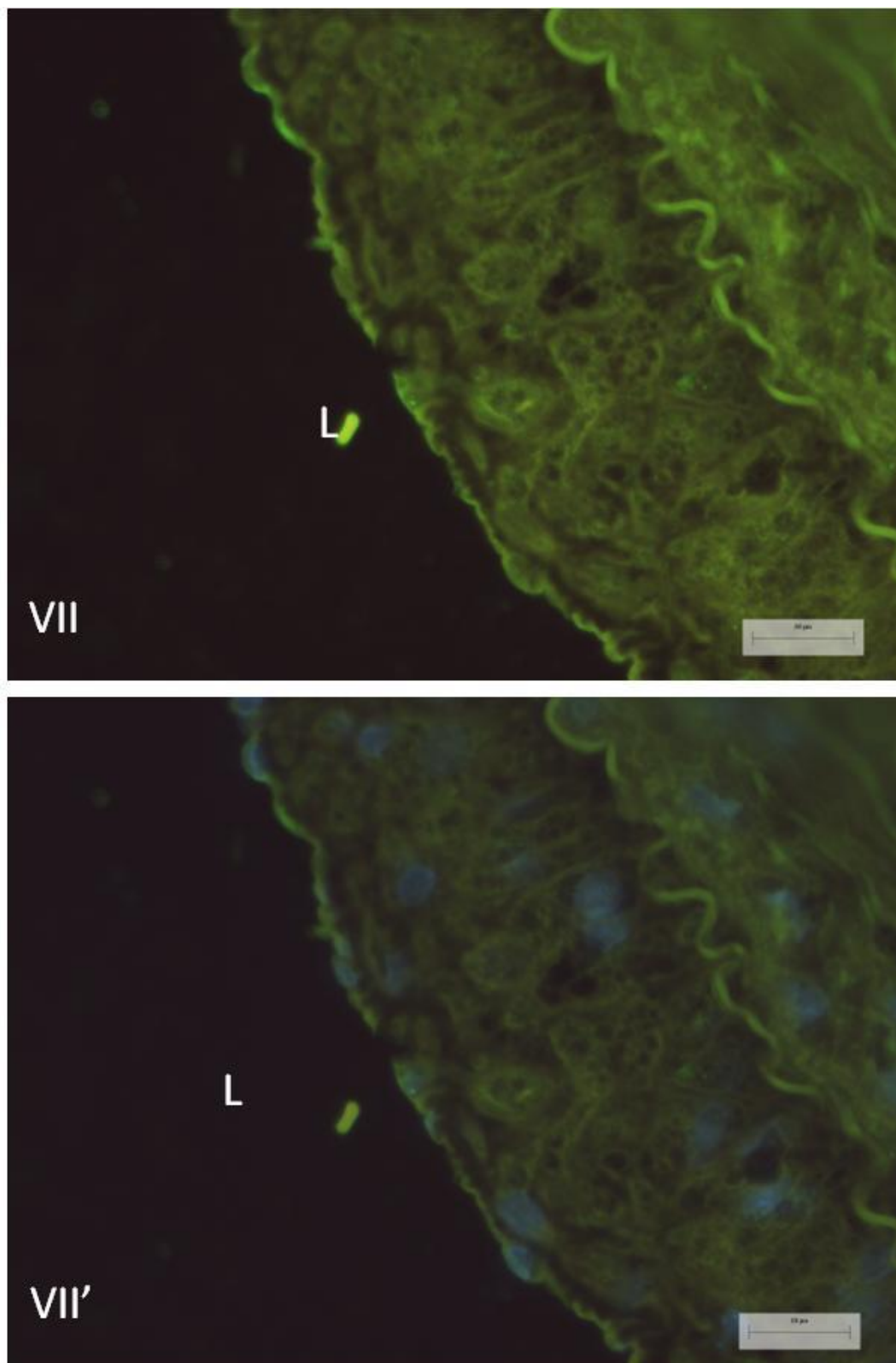


Figura 3. Fotomicrografias de amostras representativas das análises de imunofluorescência da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOs). Fluorescência verde (FITC) indica presença da enzima; fluorescência roxa indica os núcleos celulares. Artérias de coelhos tratados durante 50 dias com ração (1, 1'), ração com 1% de colesterol (2, 2'), ração com 1% de colesterol + 20mg de sinvastatina (3, 3'), ração com 1% de colesterol + 1mg de resveratrol (4, 4'), ração com 1% de colesterol + vinho tinto (5, 5'), ração com 1% de colesterol + vinho branco (6, 6'), ração com 1% de colesterol + suco de uva (7, 7'). As setas maiores indicam uma forte expressão da NOs, as menores pouca expressão da NOs e ausência da seta que não houve expressão da NOs. L = lúmen. Barra = 30µm.

Tabela 10. Análise da intensidade da expressão da enzima óxido nítrico sintase na artéria de coelhos em 50 dias de estudo

Grupos Estudados	Expressão da NOs
Grupo I	Ø
Grupo II	++
Grupo III	+
Grupo IV	+ / -
Grupo V	+++
Grupo VI	+++
Grupo VII	Ø

Ø, negativa; +/-, muito fraca; +, fraca; ++, forte; +++, muito forte.

A artéria de 5 animais em cada grupo foi examinada.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

A eNOS está localizada na membrana da célula endotelial em resposta a agonistas como a bradicina, acetilcolina, adenosina difosfato, serotonina, entre outros, ou quando há um aumento do atrito sobre a camada endotelial exercido pelas células circulantes, ocorre a fosforilação da eNOS promovendo sua translocação para o citosol e sua ativação levando à produção de NO (DUSSE *et al.*, 2003).

O NO foi o primeiro a ser descrito como um vasodilator derivado do endotélio, estando suas ações associadas à manutenção do tônus vascular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, efeito antiproliferativo e efeito antioxidativo (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003).

Os melhores resultados para expressão da eNOS observados neste estudo foram provenientes dos grupos que receberam vinho tinto e vinho branco liofilizados, enquanto no grupo de animais que receberam suco de uva liofilizado, não foi observada a expressão da eNOS. Estes efeitos observados podem ser devidos à diferença na quantidade e na natureza dos compostos fenólicos do vinho tinto, vinho branco e suco de uva (PAIXÃO *et al.*, 2007).

Estudo conduzido com pacientes com doença arterial coronariana mostrou que tanto o vinho tinto quanto o vinho branco melhoraram a

função endotelial (WILLIAMS *et al.*, 2004; KIKURA *et al.*, 2004). Em outro estudo, Wallerath *et al.* (2003) evidenciaram que o vinho tinto estimulou a expressão da eNOS em células do endotélio humano, aumentando a produção do NO.

A estatina e o resveratrol em nosso estudo expressaram a eNOS com menos intensidade do que o vinho tinto e branco liofilizados. O grupo que recebeu resveratrol teve uma expressão muito fraca da eNOS.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo observou que o vinho tinto liofilizado aumentou o HLD em relação ao resveratrol. Na indução da expressão da eNOS, o vinho tinto liofilizado apresentou resultado semelhante ao vinho branco liofilizado, sendo a indução na expressão da eNOS de ambos melhor do que a da estatina e do resveratrol. A estatina não alterou os níveis de lipídeos plasmáticos, mas reduziu significativamente a formação das células espumosas.

Portanto, parece que o vinho tinto liofilizado utiliza vários mecanismos para a prevenção das doenças cardiovasculares em coelhos hipercolesterolêmicos.

5 REFERÊNCIAS

AHN, J.; CHO, I.; KIM, S.; KWON, D.; HA, T. Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. **Journal of Hepatology**, v.49, p.1019-1028, 2008.

ARAÚJO, R. G.; CASELLA FILHO, A.; CHAGAS, A. C. P. Ezetimiba: farmacocinética e terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 85 (Suplemento V), p. 20-24, 2005.

AUGER, C.; TEISSEDER, P. L.; GERAIN, P.; LEQUEUX, N.; BORNET, A.; SERISIER, S.; BESANCON, P.; CAPORICCIO, B.; CRISTOL, J.P.; ROUANET, J.M. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation, **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 2015–2021, 2005.

BROWN, L.; KROON, P.A.; DAS, D.K.; DAS, S.; TOSAKI, A.; CHAN, V.; SINGER, M.V.; FEICK, P. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research Alcohol**, v. 33, n. 9, p. 1513-1523, 2009.

CASTELNUOVO, A.; ROTONDO, S.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M. B.; GAETANO, G. Meta-Analysis of Wine and Beer Consumption in Relation to Vascular Risk. **Circulation**, v. 105, p. 2836-2844, 2002.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-423, 2002.

CHEN, C.; LIU, L.; HSU, J.; HUANG, H.; YANG, M.; WANG, C. *Mulberry* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Food Chemistry**, v. 91, p. 601-607, 2005.

CHO, I. J.; AHN, J. Y.; KIM, S.; CHOI, M. S.; HA, T. Y. Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 367: 190–194, 2008.

DAS, M.; DAS, D. Resveratrol and cardiovascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, 2010.

DÁVALOS, A.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C.; CERRATO, F.; MARTÍNEZ-BOTAS, J.; GÓMEZ-CORONADO, D.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; LASUNCIÓN, M. A. Red grape juice polyphenols alter cholesterol homeostasis and increase LDL-Receptor activity in human cells in vitro. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1766-1773, 2006.

DUDLEY, J.; DAS, S.; MUKHERJEE, S.; DAS, D. Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 443-452, 2009.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p. 343-350, 2003.

ESTRUCH, R. Wine and cardiovascular disease. **Food Research International**, v. 33, p. 219-226, 2000.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de Alta Densidade: Aspectos Metabólicos, clínicos, Epidemiológicos e de Intervenção Terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 87, p. 672-679, 2006.

GERMAN, J. B.; WALZEM, R. L. The Health Benefits of Wine. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, p. 561-593, 2000.

JORGE, P. A. R.; ALMEIDA, E. A.; OZAKI, M. R.; JORGE, A. C. Efeitos da atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e simvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 4, p. 314-319, 2005.

KIKURA, M.; IVEY, J. H.; SAFON, R. A.; LEE, M. K.; SZLAM, F. The influence of red wine or white wine intake on platelet function and viscoelastic property of blood in volunteers. **Platelets**, v.15, p.37-41, 2004.

KRONENBERG, F. Dyslipidemia and nephrotic syndrome: Recent advances. **Journal of Renal Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 195-203, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins: patologia básica**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008. Cap. 10, p. 371-413.

KWAK, B. R.; MULHAUPT, F.; MACH, F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. **Autoimmunity Reviews**, v. 2, p. 332-338, 2003.

LEIGHTON, F.; URQUIAGA, I. Changes in cardiovascular risk factors associated with wine consumption in intervention studies in humans. **Annals of Epidemiology**, v.17, p.S32-S36, 2007.

LIAO, J. K. e LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.89-118, 2005.

LUDMAN, A.; VENUGOPAL, V.; YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Statins and cardioprotection – More than just lipid lowering? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 30-43, 2009.

LUNDBERG, A. M.; HANSSON, G. K. Innate immune signals in atherosclerosis. **Clinical Immunology**, v.134, p. 5–24, 2010.

MAMEDE, M. E. O. e PASTORE, G. M. Compostos Fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim da CEPPA**, v.22, n.2, p.233-253, 2004.

MERX, M. W.; WEBER, C. Benefits of statins beyond lipid lowering. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 3-4, p. e325-e331, 2008.

MIZOI, C. S.; DEZOTI, C.; VATTIMO, M. F. F. Função renal de pacientes de unidade de terapia intensiva: creatinina plasmática e proteína carreadora do retinol urinário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 4, p. 385-393, 2008.

MODUN, D.; MUSIC, I.; VUKOVIC, J.; BRIZIC, I.; KATALINIC, V.; OBAD, A.; PALADA, I.; DUJIC, Z.; BOBAN, M. The increase in human antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 250-256, 2008.

NIKFARDJAM, M. S. P.; LÁSZLÓ, G.; DIETRICH, H. Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from *botrytized* grapes. **Food Chemistry**, v.96, p. 74-79, 2006.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry**, v. 105, p. 204-214, 2007.

PALOZZA, P.; PARRONE, N.; SIMONE, R. E.; CATALANO, A. Lycopene in atherosclerosis prevention: An integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, 26–33, 2010.

PENUMATHSA, S. V.; THIRUNAVUKKARASU, M.; KONERU, S.; JUHASZ, B.; ZHAN, L.; PANT, R.; MENON, V. P.; OTANI, H.; MAULIK, N. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, p. 508–516, 2007.

PINHO, R. A.; ARAÚJO, M. C.; GHISI, G. L. M.; BENETTI, M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p.549-555, 2010.

RIBEIRO, J. N.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; FERREIRA Jr., D. B. F.; PINTO, A. S. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina+naringenina. **RBAC**, v. 38, n. 1, p. 23-27, 2006.

RIVERA, L.; MORÓN, R.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers

blood pressure in obese Zucker rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 1053-1063, 2009.

ROCHA, K.K.R.; SOUZA, G.A.; EBAID, G.X.; SEIVA, F.R.F.; CATANEO, A.C.; NOVELLI, E.L.B. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1362-1367, 2009.

ROCHE, M.; RONDEAU, P.; SINGH, N. R.; TARNUS, E.; BOURDON, E. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters**, v. 582, p. 1783-1787, 2008.

SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**, v. 658, p. 68-94, 2008.

SATO, M.; MAULIK, N.; DAS, D. K. Cardioprotection with Alcohol Role of Both Alcohol and Polyphenolic Antioxidants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 122-135, 2002.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J. R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003.

SILVA, R. O. P.; LOPES, A. F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008.

THIRUNAVUKKARASU, M.; PENUMATHSA, S. V.; SAMUEL, S. M.; AKITA, Y.; ZHAN, L. White wine induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is mediated by life extending Akt/FOXO3a/NFκB survival pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6733-6739, 2008.

TOLOSA, E. M. C. RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. Preparo de Corantes. In: **Manual de Técnicas para Histologia: normal e patológica**. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Manole, 2003. Cap. 12, p. 247.

TRIANI, M.; XANTHOS, T.; IACOVIDOU, N.; DAGRES, N.; LEKAKIS, J. P.; KYRIAKOU, F.; KREMASTINOS, D. T. Relationship between individual cardiovascular risk factors and localization of coronary atherosclerotic

lesions. **Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care**, v. 40, n. 3, p. 201-207, 2011.

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.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGHETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e na saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WALLERATH, T.; POLEO, D.; LI, H.; FÖRSTERMANN, U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. **Journal of the American College of Cardiology**, v.41, n. 3, 2003.

WANG, Z.; ZOU, J.; CAO, K.; HSIEH, T.; HUANG, Y.; WU, J. M. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, n.4, 2005.

WILLIAMS, M. J. A.; SUTHERLAND, W. H. F.; WHELAN, A. P.; McCORMICK, M. P.; de JONG, S. A. Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. **Metabolism**, v.53, p.318-323, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva: 2011. 153 p.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, n. 5, p. 398–406, 2008.

ZOU, J.; WANG, Z.; HUANG, Y.; CAO, K.; WU, J. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 11, p. 317-320, 2003.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE VINHO TINTO, VINHO BRANCO E SUCO DE UVA LIOFILIZADOS, RESVERATROL E SINVASTATINA NO FÍGADO DE COELHOS ADULTOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é bastante discutido o papel das dietas balanceadas, pobres em gordura e em alimentos ricos em colesterol, bem como em bebidas alcoólicas e ricas em frutas e vegetais, na redução dos riscos de distúrbios metabólicos (MORISCO *et al.*, 2008).

Os distúrbios metabólicos envolvem injúria hepática, algumas delas levando a uma lesão hepática crônica, patologia que se caracteriza por um processo inflamatório e fibrótico, que evolui progressivamente da hepatite crônica para a cirrose e hepatocarcinoma (MORISCO *et al.*, 2008).

O fígado regula muitas funções metabólicas importantes, e a injúria hepática está associada com distorções nessas funções metabólicas (ORHAN *et al.*, 2007). Muitas destas distorções nas funções metabólicas do fígado são provocadas pelo aumento do estresse oxidativo (KASDALLAH-GRISSA *et al.*, 2007). Os radicais livres estão envolvidas na lesão hepática induzida por álcool, vírus, alteração do metabolismo lipídico, dos carboidratos e dos xenobióticos (LOGUERCIO *et al.*, 2001).

A produção excessiva de radicais livres pode ultrapassar a capacidade antioxidante de enzimas e compostos antioxidantes que conduzem ao estado de stress oxidativo, influenciando a atividade de vários mediadores bioquímicos capazes de modular eventos celulares como a apoptose, fibrose, colestase e regeneração levando aos diferentes tipos de lesões hepáticas (TILG e DIEHL, 2000; TEDESCO *et al.*, 2001; STINTZING e CARLE, 2004; GÜLÇİN, 2010).

Os compostos fenólicos são as maiores fontes de antioxidantes consumidos na dieta humana e estão distribuídos amplamente em frutas,

hortaliças e em bebidas como, chá, cerveja, suco de uva e vinho (TEDESCO *et al.*, 2001; RODEIRO *et al.*, 2008). O consumo diário de polifenóis pode atingir 1 g, o que é maior que o consumo de todos os outros fitoquímicos classificados como antioxidantes (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

As bebidas alcoólicas como o vinho tinto, principalmente, apresentam outras substâncias além do etanol que favorecem a modulação dos processos bioquímicos prevenindo doenças (KLATSKY *et al.*, 2003). Os efeitos benéficos do vinho tinto têm sido associados à presença do resveratrol. Este composto exerce *in vitro* várias propriedades biológicas, tais como a inibição dose-dependente da proliferação de células estreladas. E alguns estudos demonstraram seus efeitos protetores no desenvolvimento da fibrose hepática e na progressão do câncer do hepático (MILANI *et al.*, 1990; NEAUD *et al.*, 1997; KAWADA *et al.*, 1998; MONVOISIN *et al.*, 1999).

Os benefícios à saúde associados ao consumo de vinho tinto pode ser devido a um efeito sinérgico da mistura de todos os fitoquímicos contidos nesta bebida: catequinas, antocianinas, o resveratrol, entre outros. O efeito desta mistura de compostos antioxidantes no vinho tinto tem papel central na determinação da biodisponibilidade e, assim, contribuindo na bioatividade dos compostos alimentares (MORISCO *et al.*, 2008).

As uvas e seus produtos como suco de uva e vinho contêm uma grande diversidade de polifenóis que incluem ácidos fenólicos, flavonóides complexos, antocianinas e o resveratrol. A quantidade total de polifenóis é maior na casca do que na polpa da uva roxa (ABE *et al.*, 2007; LEIFERT e ABEYWARDENA, 2008). Assim, o consumo de alimentos ricos em polifenóis poderia contribuir na prevenção das doenças hepáticas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, estatina e resveratrol nas alterações hepáticas em coelhos hipercolesterolêmicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM), Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG), e no laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), todos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.2 PREPARAÇÃO DO VINHO TINTO, VINHO BRANCO, SUCO DE UVA, RESVERATROL E SINVASTATINA

O vinho tinto utilizado foi o *Cabernet Sauvignon*, o vinho branco, o *Riesling Itália*, e o suco de uva, o integral, de marcas nacionalmente conhecidas, adquiridas no comércio local de Viçosa – MG.

Os vinhos tinto, branco e o suco de uva foram colocados em bandejas inox no volume de 200 mL e evaporados por 2 horas à temperatura de 35°C em desidratador (Excalibur – Food Dehydrator Parallexx) para eliminação do álcool e parte da água. Depois, eles foram liofilizados (Liofilizador Terroni Fauvel – LH0400/4L) por 24 horas, à temperatura de -20°C. Este processo permite a eliminação do álcool e parte da água, diminuindo o volume e preservando as características naturais dos polifenóis presentes nestas bebidas. Para avaliar a perda de álcool, foram feitos cálculos dos volumes iniciais e finais dos processos, considerando o percentual alcoólico das bebidas vinho tinto 12% e vinho branco 10,5%.

Foram encapsulados 1mg de resveratrol em pó da marca DMS e 10mg de sinvastatina obtida em farmácia de manipulação (CNPJ 01.814.922/0001-03).

2.3 ANIMAIS E DIETA

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) aprovou o protocolo experimental (198/2009) e todos os animais foram tratados de acordo com o sugerido pelas diretrizes éticas internacionais para o cuidado com animais de laboratório. Foram utilizados 35 coelhos machos, albinos, da raça Nova Zelândia (Centro de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil), com idade de cinco meses, pesando entre 2,7 a 3,2Kg. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, mantidas em ambiente com controle de temperatura e umidade ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ umidade) e ciclos de luz de 12 horas claro/escuro. A água, administrada *ad libitum*, e 120g de ração para coelhos da marca Linha Natural da Purina foram oferecidos diariamente.

Após o período de adaptação de cinco dias, os animais foram divididos ao acaso em sete grupos: Grupo I, controle negativo (CN, $n=5$), alimentado com 120 g de ração e água à vontade; Grupo II, controle positivo (CP, $n=5$), alimentado com 120 g de ração contendo 1% de colesterol e água à vontade; Grupo III (E, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 10mg de sinvastatina em cápsulas e água à vontade; Grupo IV (R, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 1mg de resveratrol oferecido em cápsulas e água à vontade; Grupo V (VT, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 4mL de vinho tinto oferecido por gavagem oral e água à vontade; Grupo VI (VB, $n=5$), que recebeu 120 g de ração contendo 1% de colesterol, 4mL de vinho branco oferecido por gavagem oral e água à vontade; e Grupo VII (S, $n=5$), que recebeu 120 g de ração

contendo 1% de colesterol, 7,8mL de suco de uva integral oferecido por gavagem oral e água à vontade. As gavagens orais e cápsulas foram administradas diariamente, sempre no mesmo período do dia, durante 50 dias.

Os animais foram submetidos a três coletas de sangue: a coleta zero antes de iniciar os tratamentos, coleta com 25 dias e 50 dias de estudo experimental. Aos 50 dias do estudo, foi feito o sacrifício e foram coletados o sangue e os tecidos dos animais para análises posteriores.

O colesterol (VETEC, Brasil) foi adicionado à ração da marca Linha Natural da Purina, que passou novamente pelos processos de peletização e secagem, realizados no Centro de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

A seleção das doses do suco de uva, vinho branco e vinho tinto foi feita acordo com o recomendado pela literatura científica para um homem adulto saudável pesando 70kg, ou seja, 250mL de suco de uva, 150mL vinho tinto e vinho branco (CASTELNUOVO *et al.*, 2002), sendo feita relação proporcional ao peso do animal.

A dose de sinvastatina foi a prescrita para um homem adulto pesando 70kg. A dose de resveratrol foi aproximadamente a contida em 150mL de vinho tinto (GERMAN e WALZEM, 2000; SOUTO, 2001).

2.4 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

2.4.1 DETERMINAÇÕES DOS LIPÍDIOS PLASMÁTICOS

O colesterol total, HDL colesterol e triacilglicerol foram determinados no plasma sanguíneo por métodos enzimáticos colorimétricos usando Kit comercial (Bioclin, Brasil). O LDL foi determinado no plasma sanguíneo por métodos enzimáticos colorimétricos usando Kit comercial (Human, Alemanha). Foram coletados

aproximadamente 4 mL de sangue em tubos heparinizados e estes foram centrifugados a 3.000rpm por 15 minutos para separação do plasma. Alíquotas de 1 mL foram retiradas e realizadas as diluições dos volumes em 5 vezes com solução salina 0,9%. Os reagentes dos respectivos Kits foram preparados e a leitura realizada no analisador multiparamétrico de bioquímica - Alizé.

2.4.2 DETERMINAÇÕES DE ENZIMAS PLASMÁTICAS

A determinação das enzimas aspartato amino transferase (AST) e glutamyltranspeptidase (γ -GT) no plasma sanguíneo foi feita pelo método cinético usando Kit comercial (Bioclin, Brasil). As enzimas alanina amino transferase (ALT) e lipase foram determinadas utilizando método colorimétrico com o uso de Kit comercial (Human, Alemanha) e a enzima fosfatase alcalina foi determinada utilizando método colorimétrico com o uso de Kit comercial (Bioclin, Brasil).

Foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue em tubos heparinizados e estes centrifugados a 3.000rpm por 15 minutos para separação do plasma. Alíquotas de 1 mL foram retiradas e realizadas as diluições dos volumes em 5 vezes com solução salina 0,9%. Os reagentes dos respectivos Kits foram preparados e a leitura realizada no analisador multiparamétrico de bioquímica - Alizé.

2.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MORFOLÓGICA DO FÍGADO

2.5.1 INCLUSÃO EM RESINA

O lobo esquerdo do fígado foi rapidamente dissecado e destinado à análise histológica, sendo então fixado em solução de Karnovsky por um

período de 24 horas e depois transferido para álcool 50%. Para a desidratação, os fragmentos hepáticos passaram por série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se ao final da série à inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica).

Foram obtidas 20 secções de 3µm de espessura em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando navalhas de vidro. As preparações referentes aos fígados foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck), e as imagens foram obtidas em fotomicroscópio Olympus AX-70. Foram obtidas 5 imagens histológicas de cada animal, utilizando objetiva de 40x.

2.5.2 MORFOMETRIA DO FÍGADO

Foi realizado o estudo morfométrico para quantificar nos cortes histológicos do fígado os seguintes elementos: hepatócitos, grandes vasos, capilares sinusoides, infiltrados leucocitários, gotículas de gordura, células degeneradas, núcleo e citoplasma de hepatócitos, além do diâmetro nuclear, volume nuclear, volume citoplasmático e volume total dos hepatócitos.

Para quantificar os elementos citados no fígado, foi utilizada uma grade de 494 pontos. Para obter a proporção de núcleo e citoplasma dos hepatócitos, foi utilizada uma grade de 100 pontos. Em ambas as grades, foram considerados os pontos a interseção entre duas linhas perpendiculares

O diâmetro nuclear foi medido em 30 núcleos esféricos de hepatócitos por corte histológico. Foram feitas 5 repetições por animal para todas as análises, totalizando 25 repetições por grupo estudado para cada análise. Para calcular os volumes do núcleo, citoplasma e total do hepatócito, foram utilizadas as seguintes equações:

Volume nuclear = $\frac{4}{3} \pi \cdot r^3$

Volume citoplasmático = (% de citoplasma . volume nuclear) / % de núcleos

Volume celular (hepatócito) = volume nuclear + volume citoplasmático

Todas as análises morfométricas foram realizadas utilizando o programa de análises de imagens *Image Pro Plus 4.0* (Media Cybernetcs) com as calibrações ajustadas para os diferentes aumentos.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi montado num esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os grupos e nas subparcelas os tempos no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados foram analisados baseados na análise de variância e de regressão. Para comparar a média da testemunha ou padrão com as demais, foi utilizado o teste de Dunnett, adotando-se o nível de 5% de probabilidade, e para comparar as médias dos grupos, foi utilizado o teste de TUKEY ao nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo, foi utilizada a análise de regressão, e os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão, utilizando o teste t, adotando o nível de 5% de probabilidade no coeficiente de determinação e no fenômeno biológico. Independentemente de a interação ser ou não significativa, optou-se pelo seu desdobramento pelo interesse em estudo. Foi utilizado o programa computacional Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 LIPÍDIOS PLASMÁTICOS

Na tabela 1 estão mostradas as médias das concentrações plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis, LDL colesterol e HDL colesterol, analisadas em coelhos aos 50 dias de estudo experimental.

No presente estudo, todos os grupos de animais que receberam uma dieta rica em colesterol, apresentaram níveis sanguíneos significativamente aumentados de colesterol total, quando se comparou com os níveis sanguíneos dos animais que receberam uma dieta normal sem adição de colesterol (Tabela 1).

Para os resultados de triacilgliceróis, o grupo VII apresentou índices plasmáticos mais altos ($p \leq 0,05$) do que os grupos I e IV. O grupo tratado com resveratrol (grupo IV) teve níveis significativamente reduzidos de triacilglicerol comparado ao grupo tratado com suco de uva (grupo VII) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios da concentração dos lipídios plasmáticos (mg/dL) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, aos 50 dias de estudo

Grupos Estudados	Colesterol Total (mg/dL)	Triacilgliceróis (mg/dL)	LDL Colesterol (mg/dL)	HDL Colesterol (mg/dL)
Grupo I	52,06 ^b	54,02 ^b	22,94 ^b	24,36 ^c
Grupo II	973,90 ^a	64,40 ^{ab}	320,80 ^a	45,81 ^{ab}
Grupo III	660,00 ^a	95,11 ^{ab}	178,20 ^{ab}	46,63 ^{ab}
Grupo IV	829,40 ^a	53,73 ^b	196,70 ^{ab}	34,65 ^{bc}
Grupo V	874,90 ^a	75,94 ^{ab}	270,90 ^a	51,72 ^a
Grupo VI	1090,30 ^a	85,58 ^{ab}	331,50 ^a	44,06 ^{ab}
Grupo VII	999,60 ^a	172,97 ^a	346,00 ^a	38,08 ^{abc}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Foram observados para o LDL colesterol na coleta de 50 dias, níveis plasmáticos de LDL colesterol aumentados ($p \leq 0,05$) para os grupos II, V, VI e VII comparados ao grupo I (Tabela 1).

Para o HDL colesterol foi verificada diferença significativa entre os grupos II, III, V, VI e o grupo I. O grupo V apresentou índices plasmáticos mais elevados ($p \leq 0,05$) de HDL colesterol comparado ao grupo IV (Tabela 1).

3.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS NAS FUNÇÕES HEPÁTICAS

Os resultados da atividade da AST estão apresentados na tabela 2. No período de 25 dias a atividade da AST no grupo III foi significativamente maior do que nos grupos I, IV, V e VII. Foi observada diferença estatística ao comparar o grupo III no tempo 25 e com o tempo zero (teste Dunnett). Na coleta de 50 dias não foi observada diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Valores médios da atividade de AST (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	77,00 ^a	58,00 ^b	83,20 ^a
Grupo II	32,00 ^a	127,00 ^{ab}	65,00 ^a
Grupo III	42,00 ^a	298,20 ^{a*}	98,00 ^a
Grupo IV	85,00 ^a	82,40 ^b	67,00 ^a
Grupo V	35,00 ^a	70,40 ^b	127,00 ^a
Grupo VI	59,00 ^a	140,00 ^{ab}	51,00 ^a
Grupo VII	45,00 ^a	43,60 ^b	81,00 ^a

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Para a atividade no plasma da enzima hepática alanina transferase não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados na coleta zero. No período experimental de 25 dias o grupo III teve a atividade da alanina transferase aumentada ($p \leq 0,05$) em relação aos grupos I, V e VI. Ao comparar o grupo III no tempo 25 com o tempo zero (teste Dunnett) foi observada diferença significativa. No tempo 50 o grupo II apresentou maior atividade da ALT comparada ao tempo zero (teste Dunnett) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios da atividade de ALT (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	65,40 ^a	48,00 ^b	64,00 ^a
Grupo II	33,60 ^a	97,80 ^{ab}	147,60 ^{a*}
Grupo III	34,20 ^a	196,80 ^{a*}	93,00 ^a
Grupo IV	45,00 ^a	90,60 ^{ab}	147,60 ^a
Grupo V	39,60 ^a	82,20 ^b	135,00 ^a
Grupo VI	39,00 ^a	40,40 ^b	93,00 ^a
Grupo VII	23,40 ^a	121,80 ^{ab}	108,00 ^a

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

As transaminases são indicadores sensíveis de dano hepático, particularmente quando é uma lesão aguda. Quando há uma lesão hepática ocorre a elevação de ambas as enzimas na circulação sanguínea, se a lesão for de origem exclusivamente hepática a ALT tem um aumento maior que a AST (NUNES e MOREIRA, 2006). A AST pode estar aumentada nas doenças de outros órgãos, mas quando estes valores são 10 vezes acima da concentração normal se caracteriza, geralmente, uma patologia hepática ou biliar (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstraram que no período de 25 dias, teve uma elevação da atividade de AST e ALT no grupo tratado com estatina, no entanto, na coleta de 50 dias não foi observada diferença significativa

entre os grupos estudados. Este aumento, possivelmente, é em decorrência a eventos adversos ao uso da estatina sobre o fígado (IZAR, 2005).

A atividade de γ -GT na coleta zero não foi diferente significativamente entre os grupos. No período de 25 dias, apenas o grupo V não apresentou diferença significativa do grupo I, os demais grupos apresentaram diferença significativa. Os grupos I e V não apresentaram maior atividade da γ -GT comparada ao tempo zero (teste Dunnett) (Tabela 4).

Na coleta de 50 dias apenas o grupo III não foi diferente significativamente do grupo I, mas foi diferente significativamente do grupo II. A estatina (grupo III) foi mais eficiente na redução ($p \leq 0,05$) da atividade de γ -GT do que o vinho branco (grupo VI). De todos os grupos que receberam a ração com 1% de colesterol, apenas o grupo V, aos 25 dias de estudo, não apresentou maior atividade da γ -GT comparada ao tempo zero (teste Dunnett) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios da atividade de γ -GT (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	12,80 ^a	9,80 ^b	14,20 ^c
Grupo II	17,40 ^a	70,00 ^{a*}	140,00 ^{a*}
Grupo III	16,60 ^a	94,00 ^{a*}	70,00 ^{bc*}
Grupo IV	14,40 ^a	89,00 ^{a*}	100,00 ^{ab*}
Grupo V	17,20 ^a	51,00 ^{ab}	105,00 ^{ab*}
Grupo VI	16,40 ^a	83,00 ^{a*}	132,00 ^{a*}
Grupo VII	10,80 ^a	85,00 ^{a*}	112,00 ^{ab*}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

A γ -GT é uma indicadora sensível das doenças hepáticas, está presente no fígado, rins, pâncreas e intestino. Entretanto a γ -GT sérica ativa é originária primariamente do fígado e níveis aumentados podem

significar, dentre outras patologias, esteatose hepática (ALVES Jr. *et al.*, 2003; MOTTA, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2006). Os resultados da atividade de γ -GT aumentada em nosso estudo poderiam indicar esteatose hepática, provocada pela hipercolesterolemia observada nos animais do estudo (Tabela 1), mas estes resultados não se confirmaram com os nossos testes histopatológicos (Figura 1 – Tabela 7).

A dieta aterogênica e os tratamentos estudados não tiveram efeito sobre a atividade da fosfatase alcalina, pois não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados em nenhum dos tempos de coleta (Tabela 5). Estes resultados são confirmados pela Tabela 12-A em que durante os 50 dias de estudo não foi verificada alteração na atividade em plasma da fosfatase alcalina.

Tabela 5. Valores médios da atividade de fosfatase alcalina (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	206,00 ^a	209,00 ^a	112,00 ^a
Grupo II	180,00 ^a	181,00 ^a	128,00 ^a
Grupo III	144,00 ^a	189,00 ^a	170,00 ^a
Grupo IV	156,00 ^a	288,00 ^{a*}	165,00 ^a
Grupo V	145,00 ^a	242,00 ^a	193,00 ^a
Grupo VI	199,00 ^a	220,00 ^a	162,00 ^a
Grupo VII	224,00 ^a	240,00 ^a	142,00 ^a

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

A fosfatase alcalina encontra-se presente em quase todos os tecidos corporais. A atividade elevada desta enzima é encontrada no epitélio intestinal, túbulos renais, ossos, leucócitos, fígado e placenta. Acredita-se que a enzima presente no sangue seja de origem hepática, assim, em concentração elevada pode diagnosticar doenças hepáticas (GORINA, 1996). No presente estudo não encontramos concentração

plasmática elevada em nenhum dos grupos estudados durante o período experimental.

Para a atividade da lipase em plasma no tempo 25, o grupo VII apresentou maior atividade da lipase ($p \leq 0,05$) comparada ao grupo I e IV (Tabela 6). No tempo 50 o grupo IV foi significativamente diferente do grupo II e não foi diferente significativamente do grupo I, demonstrando que o resveratrol diminuiu a atividade da lipase no grupo estudado (Tabela 6). O grupo que recebeu resveratrol (grupo IV), no tempo 50, apresentou menor atividade da lipase ($p \leq 0,05$) comparada ao grupo que recebeu vinho branco liofilizado (grupo VI). Os grupos V e VI, no tempo 50, tiveram maior atividade da lipase ($p \leq 0,05$) comparada ao grupo I (Tabela 6).

O grupo II teve aumento da atividade de lipase nos tempos 25 e 50 em relação ao tempo zero (Teste de Dunnett). Os grupos V e VI tiveram aumento na atividade da lipase no tempo 50 e o grupo VII no tempo 25, comparados ao tempo zero (Teste de Dunnett) (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios da atividade de lipase (U/L) em plasma de coelhos nos sete grupos estudados, avaliados em três períodos de tempo

Grupos Estudados	Tempos (dia (s))		
	Zero	25	50
Grupo I	763,50 ^a	724,80 ^b	440,00 ^c
Grupo II	431,30 ^a	1516,10 ^{ab*}	2238,60 ^{a*}
Grupo III	349,40 ^a	1271,10 ^{ab}	1151,70 ^{abc}
Grupo IV	366,60 ^a	329,94 ^b	716,00 ^{bc}
Grupo V	670,60 ^a	858,40 ^{ab}	1945,30 ^{ab*}
Grupo VI	549,90 ^a	1322,10 ^{ab}	2243,00 ^{a*}
Grupo VII	1063,30 ^a	2161,00 ^{a*}	1753,50 ^{abc}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco na linha diferem do padrão (coleta de sangue zero) ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Dunnett.

Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

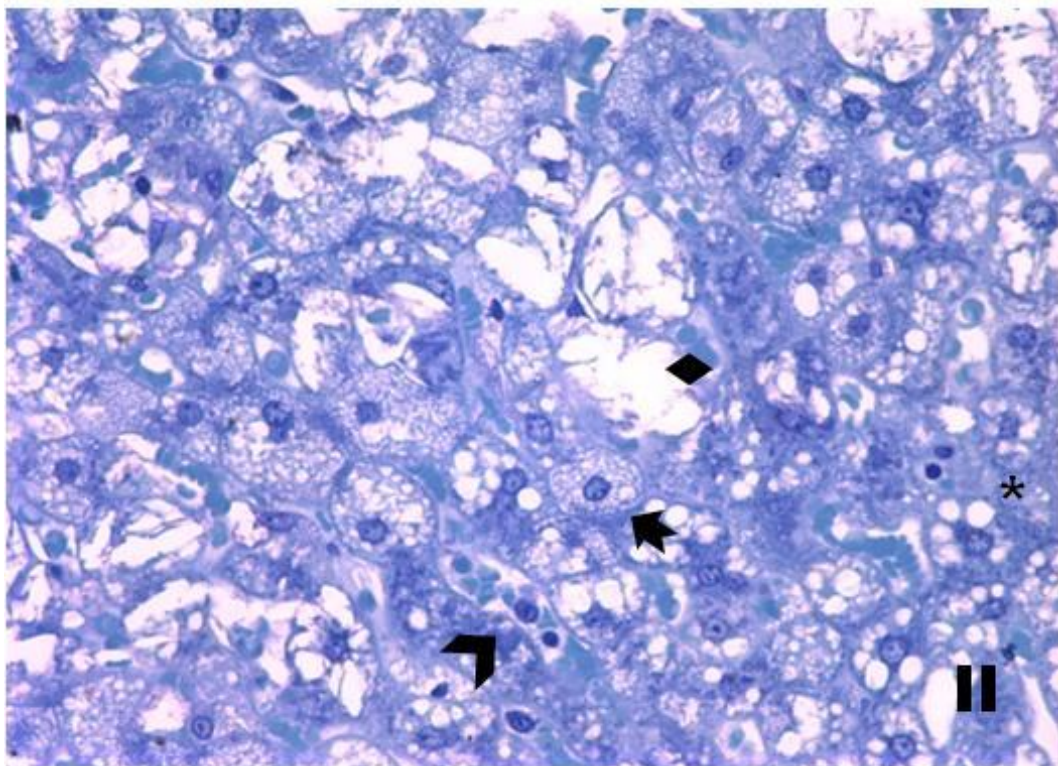
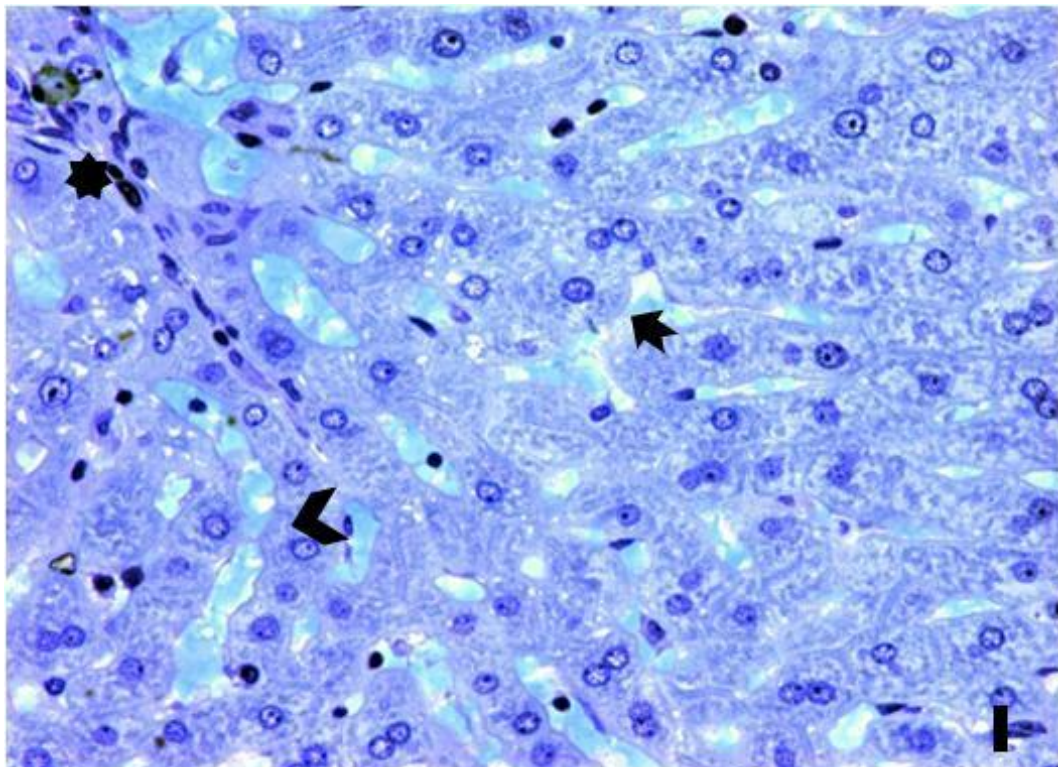
A lipase e seu cofator colipase são produzidos no pâncreas e em menor quantidade pelas glândulas salivares e mucosas gástrica, pulmonar e intestinal. A lipase é uma enzima que, no organismo, degrada

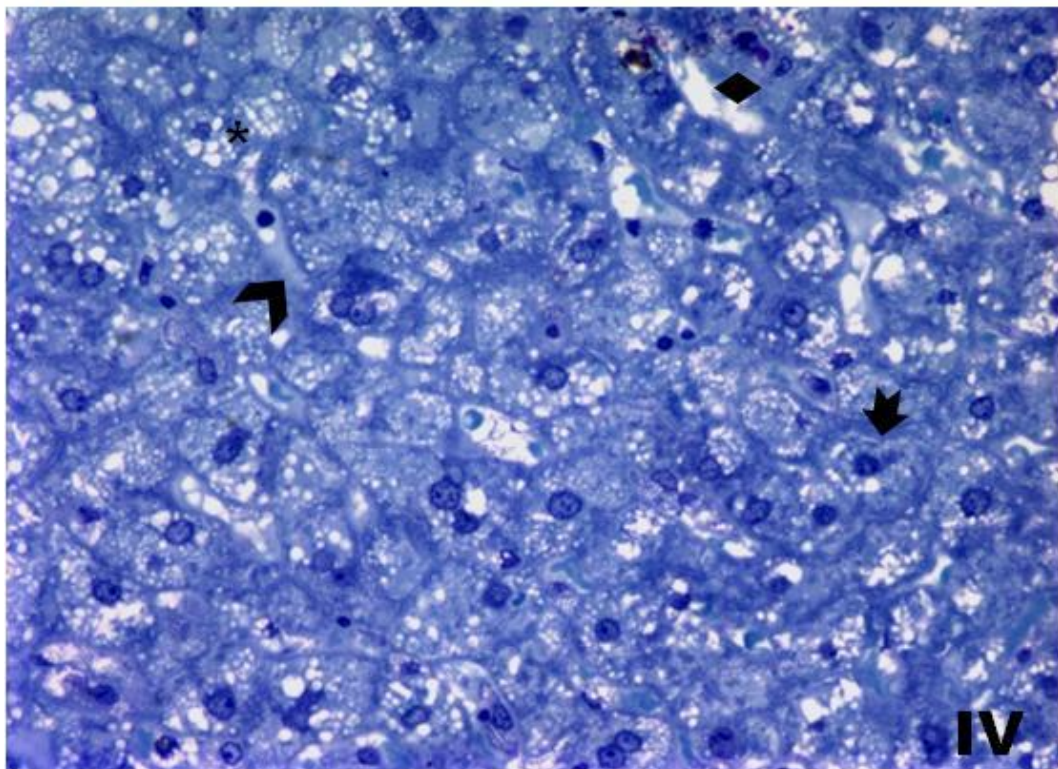
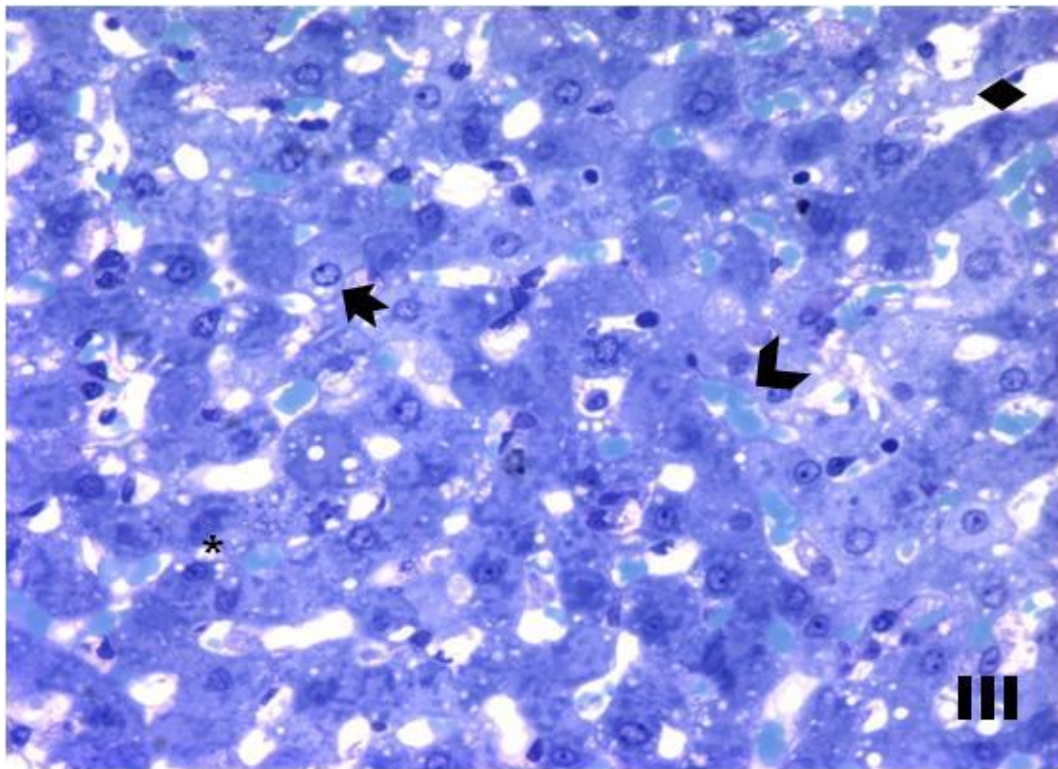
os triacilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol, índices elevados caracterizam desordens pancreáticas (LIMA, 1999).

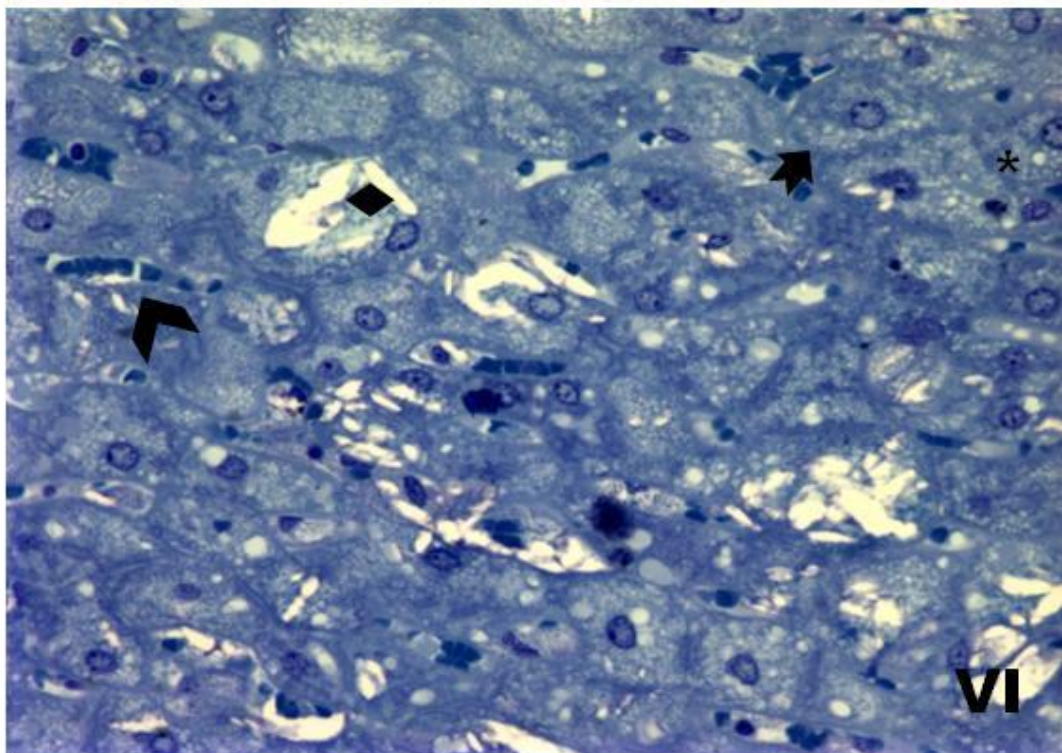
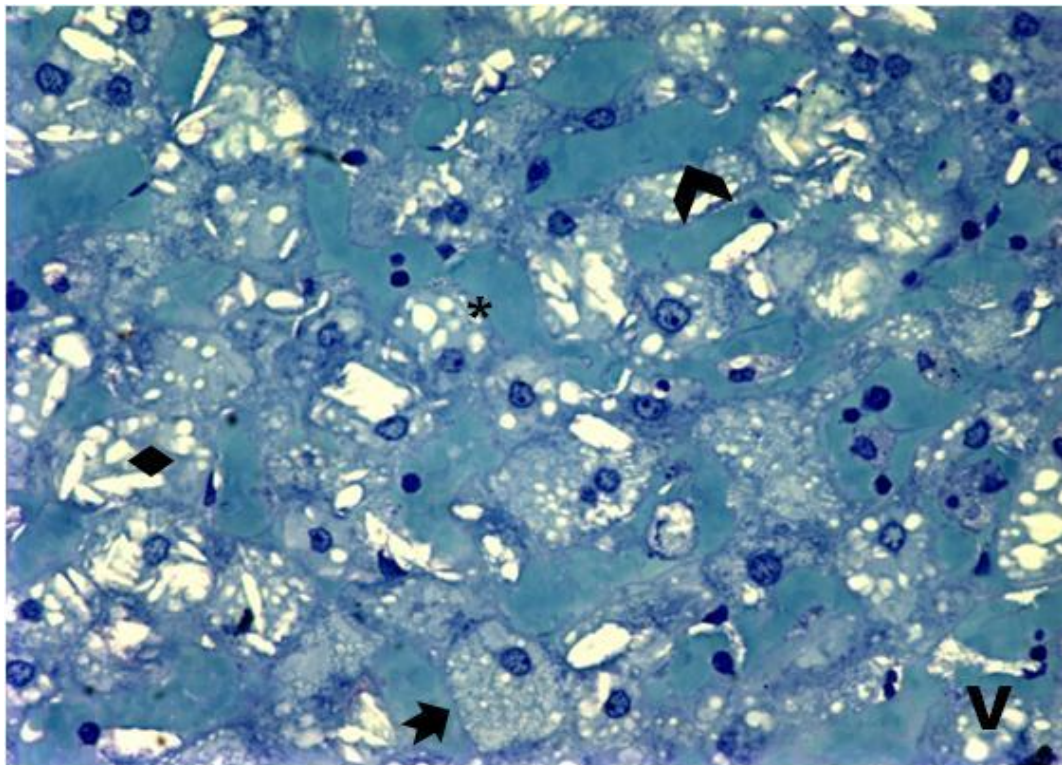
Em nosso estudo foi observado que o resveratrol reduziu significativamente a concentração plasmática de lipase, no tempo 50 (Tabela 6). Um efeito que pode ser causado por alguns polifenóis verificado em estudo como o de Sugiyama *et al.* (2007), que avaliou o efeito dos polifenóis da maçã na inibição da lipase pancreática. Foram testados frações de procianidina e de outros polifenóis, ambos extraídos da maçã. A fração de procianidina na concentração de 1,4µg/mL teve um potencial inibitório maior do que as frações de outros polifenóis da maçã na concentração de 115,9µg/mL.

3.3 EFEITO DOS TRATAMENTOS NO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES HEPÁTICAS

A figura 1 mostra as análises histológicas do fígado dos animais que participaram do estudo experimental. A figura 1 – I, que representa o grupo de animais que recebeu ração sem adição de colesterol, mostra uma estrutura normal não sendo observados células degeneradas e acúmulo de gordura nos hepatócitos. Enquanto no grupo que recebeu dieta aterogênica (Figura 1 – II), tiveram maior acúmulo de gordura e de células degeneradas. Os outros grupos estudados que receberam dieta aterogênica mais os tratamentos (Figura 1 – III, IV, V, VI e VII), tiveram acúmulo de gordura.







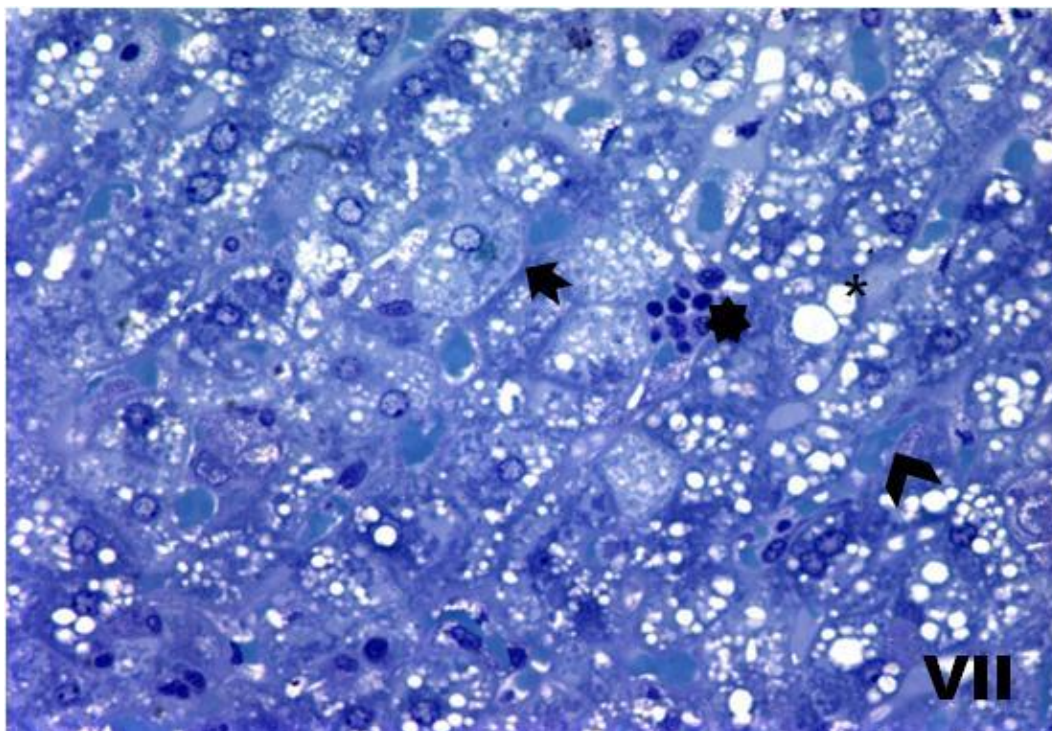


Figura 1. Fotomicrografias da seção do fígado de coelhos. Os símbolos representam: * gorduras;

➤ sinusóides; ➡ hepatócitos; ★ infiltrados; ◆ células degeneradas. I: ração+água; II: ração com 1% de colesterol+água; III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

As tabelas 7, 8 e 9 mostram os resultados morfométricos no fígado dos animais estudados. Foi observado que o número de células degeneradas foi maior no grupo que recebeu ração com 1% de colesterol (grupo II) comparado ao grupo que recebeu ração normal (grupo I) (Tabela 7). Os resultados da tabela 8 mostram que o diâmetro do núcleo do grupo V foi menor ($p \leq 0,05$) comparados aos grupos II, VI e VII.

Tabela 7. Média dos resultados morfométricos para hepatócitos, grandes vasos, sinusóides, infiltrado, gordura e células degeneradas no fígado de coelhos

Grupos Estudados	Hepatócitos	Grandes Vasos	Capilar Sinusóides	Infiltrado	Gordura	Células Degeneradas
Grupo I	356,08 ^a	31,92 ^a	28,36 ^a	11,84 ^a	37,56 ^a	28,24 ^a
Grupo II	305,00 ^a	23,92 ^a	23,84 ^a	7,76 ^a	59,36 ^a	74,12 ^b
Grupo III	328,32 ^a	24,48 ^a	53,48 ^a	12,28 ^a	42,96 ^a	32,36 ^{ab}
Grupo IV	360,96 ^a	14,08 ^a	17,96 ^a	2,64 ^a	41,32 ^a	57,04 ^{ab}
Grupo V	312,80 ^a	23,28 ^a	33,84 ^a	12,48 ^a	49,80 ^a	61,80 ^{ab}
Grupo VI	333,12 ^a	22,20 ^a	19,20 ^a	4,08 ^a	53,76 ^a	61,64 ^{ab}
Grupo VII	307,76 ^a	33,56 ^a	26,68 ^a	7,56 ^a	73,72 ^a	44,72 ^{ab}

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Tabela 8. Média dos resultados morfométricos para núcleo geral, diâmetro do núcleo, volume do núcleo no fígado de coelhos

Grupos Estudados	Núcleo Geral	Diâmetro do Núcleo (µm)	Volume do Núcleo (µm ³)
Grupo I	12,80 ^a	7,96 ^{ab}	266,72 ^a
Grupo II	13,04 ^a	8,35 ^a	306,01 ^a
Grupo III	16,72 ^a	8,06 ^{ab}	276,70 ^a
Grupo IV	17,28 ^a	7,86 ^{ab}	254,77 ^a
Grupo V	11,96 ^a	7,32 ^b	206,18 ^a
Grupo VI	16,11 ^a	8,33 ^a	309,09 ^a
Grupo VII	14,00 ^a	8,40 ^a	312,32 ^a

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Na tabela 9 se observa os resultados médios para citoplasma, hepatócito com núcleo picnótico, volume citoplasma e volume hepatócito, estes não tiveram diferença significativa entre os grupos estudados.

Foi observado um maior número de células degeneradas no grupo que recebeu dieta com 1% de colesterol em relação ao grupo que recebeu dieta sem adição de colesterol. Resultado este que indica lesões decorrentes de alterações bioquímicas, que resultam no acúmulo de substâncias no interior da célula, provocado, provavelmente, pelo excesso de colesterol.

Tabela 9. Média dos resultados morfométricos para citoplasma, hepatócito com núcleo picnótico, volume citoplasma e volume hepatócito no fígado de coelhos.

Grupos Estudados	Citoplasma	Hepatócito com Núcleo Picnótico	Volume Citoplasma (μm^3)	Volume Hepatócito (μm^3)
Grupo I	87,28 ^a	1,64 ^a	1815,76 ^a	2082,48 ^a
Grupo II	86,96 ^a	2,84 ^a	2102,34 ^a	2408,35 ^a
Grupo III	83,28 ^a	3,12 ^a	1396,24 ^a	1672,94 ^a
Grupo IV	82,72 ^a	2,48 ^a	1365,68 ^a	1620,45 ^a
Grupo V	88,04 ^a	2,16 ^a	1555,95 ^a	1762,13 ^a
Grupo VI	83,92 ^a	2,36 ^a	1700,08 ^a	2009,16 ^a
Grupo VII	86,00 ^a	2,24 ^a	1992,54 ^a	2304,86 ^a

Os resultados estão representados por média. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. Grupo I: ração+água; Grupo II: ração com 1% de colesterol+água; Grupo III: ração com 1% de colesterol+10mg de sinvastatina+água; Grupo IV: ração com 1% de colesterol+1mg de resveratrol+água; Grupo V: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho tinto oferecido+água; Grupo VI: ração com 1% de colesterol+4mL de vinho branco+água; Grupo VII: ração com 1% de colesterol+7,8mL de suco de uva integral+água.

Os resultados morfométricos demonstraram que o grupo de animais tratado com vinho tinto apresentou menor diâmetro do núcleo dos hepatócitos em relação aos animais que receberam vinho branco e suco de uva. As alterações no tamanho e na forma do núcleo têm sido frequentemente consideradas, tanto como sinais de aumento da atividade metabólica como de origem patológica (BRAUNBECK *et al.*, 1990).

4 CONCLUSÃO

Nossos resultados não foram conclusivos para afirmar o efeito do uso crônico do vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, estatina e resveratrol na prevenção a danos hepáticos.

5 REFERÊNCIAS

- ABE, L.T.; DA MOTA, R.V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.2, p. 394-400, 2007.
- ALVES Jr., A.; FONTES, D. A.; MELO, V. A.; MACHADO, M. C.; CRUZ, J. F.; SANTOS, E. A. S. Hipertensão Portal esquistossomótica: influência do fluxo sanguíneo portal nos níveis séricos das enzimas hepáticas. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 40, n. 4, p. 203-208, 2003.
- BRAUNBECK, J.B.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, p. 405-418, 1990.
- CASTELNUOVO, A.; ROTONDO, S.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M. B.; GAETANO, G. Meta-Analysis of Wine and Beer Consumption in Relation to Vascular Risk. **Circulation**, v. 105, p. 2836-2844, 2002.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- GERMAN, J.B.; WALZEM, R.L. . The health benefits of wine. **Annual Review of Nutrition**<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940346>, v. 20, p. 561-593, 2000.
- GORINA, A. B. **A clínica e laboratório**. Editora Medsi, 16ª Ed., 556p., 1996.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative food science and emerging Technologies**, v.11, p. 210-218, 2010.
- IZAR, M. C. O. Tratamento hipolipemiante em situações especiais – Pós-transplante e/ou terapia imunossupressora. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 85, Supl. 5, p. 50-57, 2005.
- KASDALLAH-GRISSA, A.; MORNAGUI, B.; AOUANI, E.; HAMMAMI, M.; MAY, M.; GHARBI, N.; ABDELAZIZ, K.; EL-FAZAA, S. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. **Life Sciences**, v.80, p. 1033-1039, 2007.
- KAWADA, N.; SEKI, S.; INOUE, M.; KUROKI, T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. **Hepatology**, v. 27, p.1265–1274, 1998.

KLATSKY, A. L. FRIEDMAN, G. D.; ARMSTRONG, M. A.; KIPP, H. Wine, Liquor, Beer, and Mortality. **American Journal of Epidemiology**, vol. 158, n. 6, p. 585–595, 2003.

LEIFERT, W. R.; ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, v. 28, p.729-737, 2008.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; GOMES, S. M.; FILHO, J. T. S. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Ciência e Agrotecnologia - Lavras**, v.23, n.3, p.626-631, 1999.

LOGUERCIO, C.; DE GIROLAMO, V.; FEDERICO, A.; FENG, S.L.; CRAFA, E.; CATALDI, V.; GIALANELLA, G.; MORO, R.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease. **Biological Trace Element Research**, v.81, p. 245–254, 2001.

MILANI, S.; HERBST, H.; SCHUPPAN, D.; SURRENTI, C.; RIECKEN, E.O.; STEIN, H. Cellular localization of type I, III, and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. **The American Journal of Pathology**, v. 137, p. 59–70, 1990.

MONVOISIN, A.; NEAUD, V.; DE LEDINGHEN, V.; DUBUISSON, L.; BALABAUD, C.; BIOULAC SAGE, P.; DESMOULIERE, A. Direct evidence that hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells is mediated by urokinase. **Journal of Hepatology**, v. 30, p. 511–518, 1999.

MORISCO, F.; VITAGLIONE, P.; AMORUSO, D.; RUSSO, B.; FOGLIANO, V.; CAPORASO, N. Foods and liver health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, p. 144–150, 2008.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, 2003. 419 p.

NEAUD, V.; FAOUZI, S.; GUIROUILH, J.; LE BAIL, B.; BALABAUD, C.; BIOULAC- AGE, P.; ROSENBAUM, J.. Human hepatic myofibroblasts increase invasiveness of hepatocellular carcinoma cells: Evidence for a role of hepatocyte growth factor. **Hepatology**, v. 26, p.1458–1466, 1997.

NUNES, P. P.; MOREIRA, A. L. **Faculdade de Medicina da Universidade do Porto**, 2006. p. 26. Serviço de Fisiologia - Fisiologia Hepática, Texto de Apoio.

ORHAN D. D.; ORHAN N.; ERGUN, F. Hepatoprotective effect of Vitis vinifera L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p.145-151, 2007.

RIBEIRO, J. N.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; FERREIRA Jr., D. B. F.; PINTO, A. S. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina+naringenina. **RBAC**, v. 38, n. 1, p. 23-27, 2006.

RODEIRO, I.; DONATO, M.T.; LAHOZ, A.; GARRIDO, G.; DELGADO, R.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Interactions of polyphenols with the P450 system: possible implications on human therapeutics. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, v.8, p. 97-106, 2008.

SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SOUTO, A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of trans-resveratrol concentrations in brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 441-445, 2001.

STINTZING, F. C. e CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in food science e technology**, v.15, p. 19-38, 2004.

SUGIYAMA, H; AKAZOME, Y.; SHOJI, T.; YAMAGUCHI, A.; YASUE, M.; KANDA, T; OHTAKE, Y. Oligomeric Procyanidins in Apple Polyphenol Are Main Active Components for Inhibition of Pancreatic Lipase and Triglyceride Absorption. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4604-4609, 2007.

TEDESCO, I; RUSSO, G. L.; NAZZARO, F.; RUSSO, M.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p. 505-511, 2001.

TILG, H.; DIEHL, A.M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1467-1476, 2000.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados observados no presente trabalho permitiram concluir que:

- O peso dos animais do estudo não variou no período estudado.
- O acréscimo de 1% de colesterol na ração induziu hipercolesterolemia nos animais do estudo.
- O resveratrol foi mais eficiente na redução dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, nos coelhos do estudo, do que o suco de uva.
- Os tratamentos avaliados no estudo não reduziu o níveis plasmáticos de LDL colesterol.
- O grupo tratado com vinho tinto teve um aumento significativo nos níveis de HDL comparados ao grupo tratado com resveratrol.
- A estatina preveniu a formação de células espumosas na artéria, contudo não induziu maior expressão da eNOS.
- Os grupos tratados com vinho tinto e vinho branco liofilizados apresentaram melhor expressão da eNOS comparados a todos os grupos do estudo.
- As enzimas hepáticas AST e ALT foram significativamente menores no grupo tratado com vinho tinto liofilizado do que no grupo tratado com estatina, no tempo 25.
- Nossos resultados não foram conclusivos para afirmar o efeito do uso crônico no vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, estatina e resveratrol na prevenção à danos hepáticos.

Apêndice A - Equações de Regressão Ajustadas das Variáveis Estudadas em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Tabela 1A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Peso em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Peso	Grupo I	$\hat{Y} = 3112$	—
	Grupo II	$\hat{Y} = 2868$	—
	Grupo III	$\hat{Y} = 2714$	—
	Grupo IV	$\hat{Y} = 3186$	—
	Grupo V	$\hat{Y} = 2941$	—
	Grupo VI	$\hat{Y} = 2900$	—
	Grupo VII	$\hat{Y} = 2939$	—

Tabela 2A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Proteínas Totais em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Proteínas Totais	Grupo I	$\hat{Y} = 73,70 + 0,94^{**}TE - 0,018^{**}TE^2$	0,52
	Grupo II	$\hat{Y} = 77,30 + 14,69^{**}TE - 0,2389^{**}TE^2$	0,84
	Grupo III	$\hat{Y} = 86,90 + 5,158^{**}TE - 0,11^{**}TE^2$	0,77
	Grupo IV	$\hat{Y} = 80,10 + 20,11^{**}TE - 0,39^{**}TE^2$	0,93
	Grupo V	$\hat{Y} = 83,90 + 10,29^{**}TE - 0,14^{**}TE^2$	0,90
	Grupo VI	$\hat{Y} = 78,00 + 9,32^{**}TE - 0,12^{**}TE^2$	0,56
	Grupo VII	$\hat{Y} = 78,70 + 12,16^{**}TE - 0,18^{**}TE^2$	0,60

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

Tabela 3A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Albumina em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Albumina	Grupo I	$\hat{Y} = 54,7 + 0,91^{**}TE - 0,022^{**}TE^2$	0,95
	Grupo II	$\hat{Y} = 55,20 + 1,78^{**}TE - 0,025^{**}TE^2$	0,84
	Grupo III	$\hat{Y} = 63,40 + 1,62^{**}TE - 0,033^{**}TE^2$	0,67
	Grupo IV	$\hat{Y} = 58,10 + 3,20^{**}TE - 0,059^{**}TE^2$	0,88
	Grupo V	$\hat{Y} = 55,80 + 1,68^{**}TE - 0,018^{**}TE^2$	0,95
	Grupo VI	$\hat{Y} = 55,40 + 1,50^{**}TE - 0,018^{**}TE^2$	0,61
	Grupo VII	$\hat{Y} = 56,60 + 2,15^{**}TE - 0,032^{**}TE^2$	0,75

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

Tabela 4A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Creatinina em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Creatinina	Grupo I	$\hat{Y} = 1,08 + 0,0045^{**}TE$	0,69
	Grupo II	$\hat{Y} = 1,09$	—
	Grupo III	$\hat{Y} = 1,51$	—
	Grupo IV	$\hat{Y} = 0,96$	—
	Grupo V	$\hat{Y} = 0,86$	—
	Grupo VI	$\hat{Y} = 0,98$	—
	Grupo VII	$\hat{Y} = 0,92$	—

****** $P \leq 0,01$

Tabela 5A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Colesterol Total em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Colesterol Total	Grupo I	$\hat{Y} = 71,92 - 0,7444^{**}TE + 0,0105^{**}TE^2$	0,7796
	Grupo II	$\hat{Y} = 56,99 + 67,89^{**}TE - 0,9791^{**}TE^2$	0,9319
	Grupo III	$\hat{Y} = 70,27 + 60,40^{**}TE - 0,9564^{**}TE^2$	0,8336
	Grupo IV	$\hat{Y} = 89,18 + 72,02^{**}TE - 1,13^{**}TE^2$	0,8111
	Grupo V	$\hat{Y} = 68,40 + 68,72^{**}TE - 1,038^{**}TE^2$	0,9169
	Grupo VI	$\hat{Y} = 67,55 + 69,50^{**}TE - 0,9672^{**}TE^2$	0,7068
	Grupo VII	$\hat{Y} = 69,90 + 79,9896^{**}TE - 1,21325^{**}TE^2$	0,7709

***** $P \leq 0,05$

****** $P \leq 0,01$

Tabela 6A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Triacilglicerol em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Triglicerídeo	Grupo I	$\hat{Y} = 134,63$	—
	Grupo II	$\hat{Y} = 71,88$	—
	Grupo III	$\hat{Y} = 98,46$	—
	Grupo IV	$\hat{Y} = 69,46$	—
	Grupo V	$\hat{Y} = 94,64$	—
	Grupo VI	$\hat{Y} = 116,41$	—
	Grupo VII	$\hat{Y} = 138,33$	—

Tabela 7A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável LDL Colesterol em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
LDL Colesterol	Grupo I	$\hat{Y} = 31,78$	—
	Grupo II	$\hat{Y} = 29,79+21,9966^{**}TE-0,3235^{**}TE^2$	0,9207
	Grupo III	$\hat{Y} = 39,55+33,78^{**}TE-0,6202^{**}TE^2$	0,7842
	Grupo IV	$\hat{Y} = 45,38+24,86^{**}TE-0,4367^{**}TE^2$	0,7677
	Grupo V	$\hat{Y} = 33,70+23,62^{**}TE-0,3774^{**}TE^2$	0,8853
	Grupo VI	$\hat{Y} = 34,6300+28,6682^{**}TE-0,4546^{*}TE^2$	0,6336
	Grupo VII	$\hat{Y} = 36,66+21,15^{**}TE-0,2993^{*}TE^2$	0,7240

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

Tabela 8A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável HDL Colesterol em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
HDL Colesterol	Grupo I	$\hat{Y} = 16,16-0,44^{*}TE+0,012^{**}TE^2$	0,61
	Grupo II	$\hat{Y} = 13,54+0,6782^{**}TE$	0,70
	Grupo III	$\hat{Y} = 15,81+0,67^{**}TE$	0,66
	Grupo IV	$\hat{Y} = 33,27$	—
	Grupo V	$\hat{Y} = 18,11+0,70^{**}TE$	0,90
	Grupo VI	$\hat{Y} = 11,54+0,62^{**}TE$	0,77
	Grupo VII	$\hat{Y} = 32,63$	—

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

Tabela 9A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável AST em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
AST	Grupo I	$\hat{Y} = 72,73$	—
	Grupo II	$\hat{Y} = 74,67$	—
	Grupo III	$\hat{Y} = 146,07$	—
	Grupo IV	$\hat{Y} = 78,13$	—
	Grupo V	$\hat{Y} = 31,46+1,84^{**}TE$	0,60
	Grupo VI	$\hat{Y} = 83,33$	—
	Grupo VII	$\hat{Y} = 56,53$	—

** $P \leq 0,01$

Tabela 10A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável ALT em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
ALT	Grupo I	$\hat{Y} = 59,20$	0,6921
	Grupo II	$\hat{Y} = 36,00+2,28^{**}TE$	
	Grupo III	$\hat{Y} = 108$	
	Grupo IV	$\hat{Y} = 94,40$	0,5952
	Grupo V	$\hat{Y} = 37,90+1,91^{**}TE$	
	Grupo VI	$\hat{Y} = 39,00-0,9680TE+0,041^{*}TE^2$	0,6451
	Grupo VII	$\hat{Y} = 84,40$	—

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

Tabela 11A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável γ -GT em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
gama-GT	Grupo I	$\hat{Y} = 12,27$	0,64
	Grupo II	$\hat{Y} = 14,50+2,45^{**}TE$	
	Grupo III	$\hat{Y} = 16,60+5,12^{**}TE-0,08^{**}TE^2$	
	Grupo IV	$\hat{Y} = 14,40+4,26^{**}TE-0,051^{*}TE^2$	0,67
	Grupo V	$\hat{Y} = 13,83+1,76^{**}TE$	0,80
	Grupo VI	$\hat{Y} = 19,33+2,31^{**}TE$	0,63
	Grupo VII	$\hat{Y} = 18,66+2,02^{**}TE$	0,65

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

Tabela 12A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Fosfatase Alcalina em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R ² /r ²
Fosfatase Alcalina	Grupo I	$\hat{Y} = 175,67$	—
	Grupo II	$\hat{Y} = 163$	—
	Grupo III	$\hat{Y} = 168$	—
	Grupo IV	$\hat{Y} = 203$	—
	Grupo V	$\hat{Y} = 193$	—
	Grupo VI	$\hat{Y} = 193$	—
	Grupo VII	$\hat{Y} = 202$	—

Tabela 13A. Equações de Regressão Ajustadas da Variável Lipase em Função do Tempo de Coleta para os Respectivos Grupos e os Coeficientes de Determinação.

Variável	Grupo	Equações Ajustadas	R^2/r^2
Lipase	Grupo I	$\hat{Y} = 643$	—
	Grupo II	$\hat{Y} = 491,68 + 36,15^{**}TE$	0,64
	Grupo III	$\hat{Y} = 924$	—
	Grupo IV	$\hat{Y} = 471$	—
	Grupo V	$\hat{Y} = 1158$	—
	Grupo VI	$\hat{Y} = 1372$	—
	Grupo VII	$\hat{Y} = 1659$	—

****** $P \leq 0,01$

F. V.	GL	Quadrado Médio				
		P	CT	LDL	HDL	TG
Grupos (G)	6	367636**	1002984**	101308,6**	538,65**	11530,33*
Resíduo (a)	28	77268,93	74832,12	13199,97	77,46	3887,75
Tempo (TE)	2	1646,67 ^{NS}	8511797**	954575,3**	5216,24**	24205,51**
G X TE	12	11411,39 ^{NS}	272832**	38801,27**	260,70**	7761*
Resíduo (b)	56	34087,86	45590,65	6543,40	65,70	3536,98
C V (%) Parcela		9,42	46,07	54,08	29,40	60,30
C V (%) Subparcela		6,25	35,96	38,08	27,07	57,52

** F Significativo ao nível de 1%
 * F Significativo ao nível de 5%
 NS F Não Significativo ao nível de 5%

Quadro 2B Resumo da Análise de Variância das Variáveis Creatinina (CR), Proteínas Totais (PTN) e Albumina (ALB) para os Grupos e Tempos de Avaliações:				
F. V.	GL	Quadrado Médio		
		CR	PTN	ALB
Grupos (G)	6	0,7307 ^{NS}	37377,83**	1021,75**
Resíduo (a)	28	0,6692	1849,80	48,21
Tempo (TE)	2	0,2155 ^{NS}	206332,4**	6709,23**
G X TE	12	0,6587 ^{NS}	17713**	524,36**
Resíduo (b)	56	0,5741	2422,59	63,09
C V (%) Parcela		76,20	26,70	9,65
C V (%) Subparcela		70,58	30,56	11,04
** F Significativo ao nível de 1% * F Significativo ao nível de 5% NS F Não Significativo ao nível de 5%				

