

**ELIANA ALVIAREZ GUTIERREZ**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CONSUMO DO VINHO TINTO *Cabernet sauvignon*  
NA HIPERCOLESTEROLEMIA, NA HEPATOXICIDADE E NO  
DESENVOLVIMENTO DE PLACAS ATROSCLERÓTICAS EM COELHOS DA  
RAÇA NOVA ZELÂNDIA**

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 Scientae*.

Orientador. Paulo Cesar Stringheta

Coorientador. Sérgio Luís Pinto da Matta

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A475a  
2019 Alviárez Gutierrez, Eliana, 1988-  
Avaliação do efeito do consumo do vinho tinto *Cabernet  
sauvignon* na hipercolesterolemia, na hepatotoxicidade e no  
desenvolvimento de placas ateroscleróticas em coelhos de raça  
nova Zelândia / Eliana Alviárez Gutierrez. – Viçosa, MG, 2019.  
96 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Aterosclerose. 2. Vinho tinto. 3. Hipercolesterolemia.  
4. Estresse oxidativo. 5. Aorta. 6. Fígado. 7. Colesterol.  
8. Bebidas não alcoólicas. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
II. Título.

CDD 22. ed. 616.136

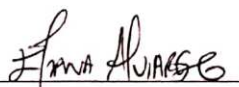
ELIANA ALVIAREZ GUTIERREZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CONSUMO DO VINHO TINTO *Cabernet  
sauvignon* NA HIPERCOLESTEROLEMIA, HEPATOXICIDADE E NO  
DESENVOLVIMENTO DE PLACAS ATROSCLERÓTICAS EM COELHOS  
DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA**

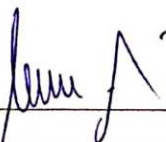
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2019.

Assentimento:



Eliana Alvarez Gutierrez  
(Autora)



Paulo Cesar Stringheta  
(Orientador)

**A minha mãe por sempre  
acreditar em mim e me apoiar  
nos meus sonhos**

## AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pelas bênçãos recebidas cada dia, pela fortaleza que me tem dado para suportar todas as adversidades ao longo da vida e, por sempre estar comigo e com minha família.

Agradeço a minha mãe Maria Nuria Gutierrez, porque a pesar da distância sempre está com uma voz de alento para me dar força para suportar os desafios durante esse Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para estrangeiros junto com a Embaixada do Brasil. À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Cesar Stringheta, agradeço por ter me acolhido como a sua estudante, agradeço porque desde o primeiro dia teve confiança em mim. Sempre tem apoiado aqui no Brasil, agradeço pelos ensinamentos, amizade, conselhos, porque tem acreditado no meu trabalho e sempre tem uma frase para me dar mais confiança e me tranquilizar.

Ao Professor, o Dr. Sergio Luis Pinto da Matta, meu coorientador desde o mestrado, agradeço pelos ensinamentos, pela confiança para a realização do trabalho, pela amizade, as risadas, os conselhos, os papos na hora do café, pela paciência, amizade e ter me acolhido como uma orientada, agradeço muito a sua confiança e colaboração na realização do trabalho.

A os demais membros da banca o Dr. Clovis Andrade Neves, a Dra. Adriana Correia Mendonça e Dra. Viviane Gorete Silveira Mouro, pela disponibilidade nesta para participar na banca e pelas importantes contribuições para melhorar o trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos (LacBio), agradeço principalmente pela amizade ao longo desses anos, pelos conhecimentos compartilhados. Muito Obrigada a Barbarin, Mariane, Amanda, Thais. Pelos companheiros antigos do LacBio, que compartilharam comigo e ainda continua a amizade, a Adriana, Juliana, Daniele, Mariana, Kellen, Elder “capuchinho”, Jeferson, Thais Lessa.

Aos Colegas do Laboratório de Biologia celular e estrutural, agradeço acolhida, os ensinamentos e os papos divertidos na hora do café. Agradeço especialmente e Janaina, Ana Luiza, Viviane, Amanda, Talita, Diane e, Elizabeth.

Ao meu namorado Paúl, agradeço pelo amor, paciência durante este tempo de Doutorado e relacionamento a distância, porque tem sido uma pessoa que me tem ajudado e dado força para continuar o trabalho.

Agradeço á Professora Ângela Stringheta pela amizade e conselhos, que junto com o Professor Stringheta, tem sido como uns pais no Brasil desde há 7 anos, me-ajudado nos momentos difíceis e contribuído para finalizar esta importante etapa do Doutorado.

Aos veterinários, Ítalo, Adriana, Andrés pela ajuda e cuidado com os animais. Ao Bruno do Laboratório de Nutrição animal do DZO, pela colaboração durante a elaboração da ração.

Agradeço ao Professor Jose Francisco da Silva (Juquinha), pela amizade e colaboração e foi quem me facilitou o contato para a realização e transporte da ração dos animais.

Ao Celito e Manuel o mexicano, quem me ajudaram durante o experimento no cuidado dos animais.

Agradeço a todas as pessoas que maneira direta o indiretamente contribuíram na minha formação pessoal, intelectual e me ajudaram a seguir meus sonhos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

ALVIAREZ GUTIERREZ, Eliana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Avaliação do efeito do consumo do vinho tinto *Cabernet sauvignon* na hipercolesterolemia, na hepatotoxicidade e no desenvolvimento de placas ateroscleróticas em coelhos de raça nova Zelândia.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Coorientador: Sérgio Luis Pinto da Matta

O aumento do consumo de alimentos ricos em lipídios tem favorecido para que as doenças cardiovasculares sejam as principais causas de morte no mundo. O incremento de LDL-c, leva a deposição dessas lipoproteínas na camada íntima das artérias, desenvolvendo a progressão da placa de ateroma. De igual maneira, o excesso de lipídios no organismo leva ao desenvolvimento de doenças hepáticas como a esteatose. A sinvastatina, é o medicamento utilizado para diminuir os níveis de colesterol plasmático, que favorece na redução da formação das placas ateroscleróticas, não obstante, se tem evidenciado efeitos colaterais. Por conseguinte, estão sendo pesquisadas outras alternativas para ajudar a reduzir o consumo da sinvastatina. O vinho tinto, conhecido por ser uma fonte rica em compostos bioativos, parece ser uma boa alternativa. Segundo o *Paradoxo Francês*, o consumo de vinho tinto ajuda na redução do risco de doenças cardiovasculares. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito ateroprotetor e hepatoprotetor do consumo de vinho tinto *Cabernet sauvignon*, em diferentes dosagens de álcool (13 %, 8 % e 4 %) e vinho tinto sem álcool em coelhos hipercolesterolêmicos. Foram utilizados 30 coelhos machos da raça Nova Zelândia, que foram divididos em 6 grupos: ração hipercolesterolêmica; ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia<sup>-1</sup>; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool. Os animais foram tratados por 30 dias, ao longo do experimento se realizaram três coletas do sangue nos tempos zero, quinze e trinta dias. Foram determinados os níveis plasmáticos sanguíneos de Colesterol total (Ct), colesterol LDL (LDL-c), colesterol HDL (HDL-c), triglicérides, dos marcadores hepáticos e renal. Ao final do experimento foi realizada a eutanásia e se coletaram fragmentos do tecido hepático e aórtico, se avaliaram os biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e proteínas carboniladas) e as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST, foi realizado o análise histológico e a avaliação dos parâmetros morfométricos dos tecidos hepáticos

e aórticos. Os resultados mostraram que o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica e o vinho tinto com e sem álcool, aumentaram os níveis plasmáticos de Ct, LDL-c, triglicérides, lipase e  $\gamma$ GT, sem afetar os níveis de HDL-c, nem os parâmetros bioquímicos da função renal. Nos biomarcadores do estresse oxidativo no tecido aórtico foi demonstrado que o consumo de vinho tinto 13 % e 8 % aumentaram os níveis da atividade da GST, o vinho tinto 8 % apresentou redução da peroxidação lipídica pelo MDA, e tanto o vinho tinto com e sem álcool reduziram a produção de proteína carbonilada. No tecido hepático houve aumento dos níveis das enzimas SOD e CAT no grupo fornecido com vinho tinto sem álcool, no grupo fornecido com vinho tinto 13 % somente teve aumento na enzima SOD. Os resultados evidenciaram que o vinho tinto mesmo sem álcool foi capaz de diminuir o acúmulo de lipídios no fígado, evitando a progressão da esteatose e da placa de ateroma, obtendo resultados tão eficientes quanto o reportado na sinvastatina.

Palabras-chave: Vinho tinto. Bebidas não alcoólicas. Hipercolesterolemia. Aorta. Fígado.

## ABSTRACT

ALVIAREZ GUTIERREZ, Eliana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Evaluation of the effect of consumption of *Cabernet sauvignon* red wine in hypercholesterolemia, in hepatotoxicity and the development of atherosclerotic plaques in New Zealand rabbits.** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Co-adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta

The increase in consumption of foods rich in lipids has favored cardiovascular diseases to be the main causes of death in the world. The increase in LDL-c leads to the deposition of these lipoproteins in the inner layer of the arteries, developing the progression of the atheromatous plaque. Likewise, excess lipids in the body lead to the development of liver diseases such as steatosis. Simvastatin is the drug used to decrease plasma cholesterol levels, which favors the reduction of the formation of atherosclerotic plaques, despite side effects. Therefore, other alternatives are being researched to help reduce the consumption of simvastatin. Red wine, known to be a rich source of bioactive compounds, seems to be a good alternative. According to the French Paradox, the consumption of red wine helps in reducing the risk of cardiovascular diseases. In this sense, the objective of the work was to evaluate the atheroprotective and hepatoprotective effect of the consumption of red Cabernet sauvignon wine, in different dosages of alcohol (13 %, 8 % and 4 %) and non-alcoholic red wine in hypercholesterolemic rabbits. Thirty male New Zealand rabbits were used, which were divided into 6 groups: hypercholesterolemic diet; hypercholesterolemic ration + simvastatin  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{day}^{-1}$ ; hypercholesterolemic diet + 6 mL red wine 13 %; hypercholesterolemic diet + 6 mL red wine 8 %; hypercholesterolemic ration + 6 mL 4 % red wine; hypercholesterolemic ration + 6 mL non-alcoholic red wine. The animals were treated for 30 days, during the experiment three blood samples were collected at times zero, fifteen and thirty days. Blood plasma levels of total cholesterol (Ct), LDL cholesterol (LDL-c), HDL cholesterol (HDL-c), triglycerides, hepatic and renal markers were determined. At the end of the experiment, euthanasia was performed and fragments of liver and aortic tissue were collected, oxidative stress biomarkers (MDA and carbonylated proteins) and antioxidant enzymes SOD, CAT and GST were evaluated, histological analysis and morphometric parameters of liver and aortic tissues. The results showed that the supply of a hypercholesterolemic diet and red wine with and without alcohol, increased plasma levels of Ct, LDL-c,

triglycerides, lipase and  $\gamma$ GT, without affecting HDL-c levels or biochemical parameters of function renal. In the biomarkers of oxidative stress in the aortic tissue, it was shown that consumption of red wine 13 % and 8 % increased levels of GST activity, red wine 8 % showed a reduction in lipid peroxidation by MDA, and both red wine with and non-alcoholic red wine reduced the production of carbonylated protein. The liver tissue was increased levels of SOD and CAT in the group supplied with non-alcoholic red wine, the group supplied with only 13 % red wine had increased SOD enzyme. The results showed that red wine, even non-alcoholic red wine, was able to decrease the accumulation of lipids in the liver, preventing the progression of steatosis and atheromatous plaque, obtaining results as efficient like reported with simvastatin.

Keywords: Red wine. Non-alcoholic drinks. Hypercholesterolemia. Oxidative stress. Aorta. Liver

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1. Compostos bioativos .....	15
2.2. Compostos fenólicos .....	16
2.3. Compostos fenólicos no vinho tinto .....	20
2.4. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos .....	22
2.5. Dislipidemia .....	24
2.6. Classificação de lipoproteínas .....	24
2.7. Colesterol.....	25
2.8. Ateroscleroses.....	26
2.9. Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) .....	28
3. OBJETIVOS .....	31
3.1. Objetivo geral .....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
ARTIGO I. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CONSUMO DO VINHO TINTO <i>Cabernet Sauvignon</i> COM E SEM ÁLCOOL NA AORTA DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA.....	38
1. INTRODUÇÃO .....	41
2. Material e métodos.....	42
2.1. Amostras do vinho tinto .....	42
2.2. Determinação de compostos fenólicos .....	42
2.3. Determinação de antocianinas totais .....	43
2.4. Determinação da capacidade antioxidante .....	43
2.5. Ensaio biológico .....	43

2.5.1.	Animais e dieta.....	43
2.5.2.	Coleta de sangue e tecido.....	44
2.5.3.	Análises do plasma sanguíneo .....	45
2.6.	Biomarcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica .....	45
2.6.1.	Ensaio da atividade superóxido dismutase (SOD).....	45
2.6.2.	Atividade da catalase (CAT).....	46
2.6.3.	Atividade da glutathione-s-transferase (GST) .....	46
2.6.4.	Peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico).....	46
2.6.5.	Proteína carbonilada .....	47
2.7.	Avaliação histológica da aorta.....	47
2.7.1.	Inclusão em resina.....	47
2.7.2.	Morfometria da aorta.....	48
2.8.	Análise estatística .....	48
3.	RESULTADOS .....	48
3.1.	Compostos fenólicos .....	48
3.2.	Plasma sanguíneo .....	49
3.3.	Biomarcadores de estresse oxidativo e peroxidação .....	51
3.4.	Avaliação histológica da aorta.....	52
4.	DISCUSSÃO .....	54
5.	CONCLUSÕES .....	59
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ARTIGO II. CONSUMO DIÁRIO DO VINHO TINTO <i>Cabernet Sauvignon</i> PROMOVE PROTEÇÃO HEPÁTICA EM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS.....		
1.	INTRODUÇÃO.....	68
2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	69
2.1.	Amostras do vinho tinto .....	69
2.2.	Ensaio biológico .....	69
2.2.1.	Animais e dieta.....	69

2.2.2.	Coleta do sangue e tecido.....	70
2.2.3.	Medidas biométricas .....	71
2.2.4.	Análises dos parâmetros bioquímicos.....	71
2.3.	Biomarcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	71
2.3.1.	Ensaio da atividade superóxido dismutase (SOD).....	71
2.3.2.	Atividade da catalase (CAT).....	72
2.3.3.	Atividade da glutathione-s-transferase (GST) .....	72
2.3.4.	Peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS (substância reativa do ácido tiobarbitúrico).....	72
2.3.5.	Determinação de proteína carbonilada.....	72
2.4.	Avaliação histológica e morfométrica do fígado.....	73
2.4.1.	Inclusão em resina.....	73
2.4.2.	Morfometria do fígado .....	73
2.5.	Análise estatística .....	74
3.	RESULTADOS .....	75
3.1.	Efeito do vinho tinto nos marcadores hepáticos.....	75
3.2.	Efeito do consumo do vinho tinto com e sem álcool nos parâmetros bioquímicos da função renal .....	77
3.3.	Biomarcadores do estresse oxidativo no tecido hepático .....	79
3.4.	Parâmetros biométricos .....	80
3.5.	Efeito das diferentes porcentagens de álcool do vinho tinto na estereologia e histomorfometria hepática.....	80
4.	Discussão .....	84
5.	Conclusões.....	91
6.	Referências bibliográficas.....	91
7.	CONCLUSÕES GERAIS.....	96

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo, sendo a hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão, obesidade, sedentarismo, diabetes, consumo excessivo de álcool, baixo consumo de alimentos ricos em compostos bioativos, os fatores principais para desenvolver a aterosclerose (APOSTOLIDOU et al., 2015)

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela deposição dos altos níveis de LDL-c que são oxidados (YOSHIDA; KISUGI, 2010), sendo depositados na camada íntima das artérias, formando posteriormente placas de ateroma em resposta imunológica pelo aumento dos lipídios na parede da artéria devido à disfunção endotelial (KIERSZENBAUM A. L., 2012). A disfunção endotelial aumenta a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), facilitando o aumento dos macrófagos que captam o LDL oxidado, que se tornam em células espumosas, constituindo a placa ateromatosa (KIERSZENBAUM 2012).

Outro processo que contribui para o desenvolvimento da aterosclerose é o estresse oxidativo provocado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas durante o metabolismo celular e pelos fatores ambientais. As EROS, são caracterizadas por serem moléculas altamente reativas que reagem com moléculas biológicas das células, alterando suas funções e estruturas (BIRBEN et al., 2012). Nesse processo contribui para o desenvolvimento da aterosclerose, a qual é gerada por um desequilíbrio entre os antioxidantes e as EROS, levando à modificação das biomoléculas, como oxidação das proteínas e aumento de produtos da peroxidação lipídica (MAHMOUDI, 2018).

Atualmente o medicamento sinvastatina, é amplamente utilizado para reduzir os níveis de colesterol plasmático, mediante a redução da atividade da HMG CoA. Assim também é utilizado de forma preventiva contra a progressão de doenças cardiovasculares estabilizando as placas ateroscleróticas, efeito anti-inflamatório e antitrombótico (BELTOWSKI; WOJCICKA; JAMROZ-WISNIEWSKA, 2009; WARD; WATTS; ECKEL, 2019). Não obstante, tem-se evidenciado que em 10-15 % da população, seu uso contínuo, tem gerado efeitos colaterais como desenvolvimento de doenças musculares (SAMSs), diabetes mellitus tipo 2, problemas neurológicos,

neurocognitivos, hepatotoxicidade e toxicidade renal (WARD; WATTS; ECKEL, 2019). Por isso, é importante buscar alternativas que tenham efeitos hipocolesterolêmicos sem ter efeitos secundários.

Estudos reportam o benefício de se consumir alimentos ou bebidas ricas em compostos bioativos. Dessa forma, alimentos com alto teor de compostos fenólicos (flavonoides), ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos e carotenoides, pode reduzir o risco de desenvolver doenças relacionadas com o aumento do estresse oxidativo no organismo. Vários estudos têm reportado os benefícios do consumo de alimentos ou bebidas ricas em compostos bioativos (BOEING et al., 2012; KISHIMOTO; TANI; KONDO, 2013).

O consumo do vinho tinto tem sido relacionado com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, pois a partir do Paradoxo Francês, observou que os franceses apesar de ter uma dieta rica em gordura, tinham o menor índice de mortalidade relacionado às doenças cardiovasculares, o que relacionou ao alto consumo do vinho tinto (LIPPI et al., 2010).

O vinho tinto, além do álcool, tem um alto teor de compostos fenólicos como os flavonoides (antocianinas), os ácidos hidroxicinâmicos ácidos benzoicos, estilbenos (resveratrol) (HASEEB; ALEXANDER; BARANCHUK, 2017). Dentre estes destacam-se as antocianinas e o resveratrol, pois acredita-se que sejam responsáveis pelas propriedades benéficas à saúde (NOGUER et al., 2012). De igual maneira, há pesquisas indicando que os benefícios do consumo do vinho tinto são causados pelo álcool presente (SCHRIEKS et al., 2013) e outros estudos tem reportado que é por causa do efeito de sinergismo entre esses dois componentes (ARENDDT et al., 2005).

Desse modo, o objetivo deste trabalho, foi avaliar o efeito protetor do consumo de vinho tinto em diferentes porcentagens de álcool (13 %, 8 %, 4%) e vinho tinto sem álcool no tecido hepático e aórtico de coelhos alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica durante 30 dias.

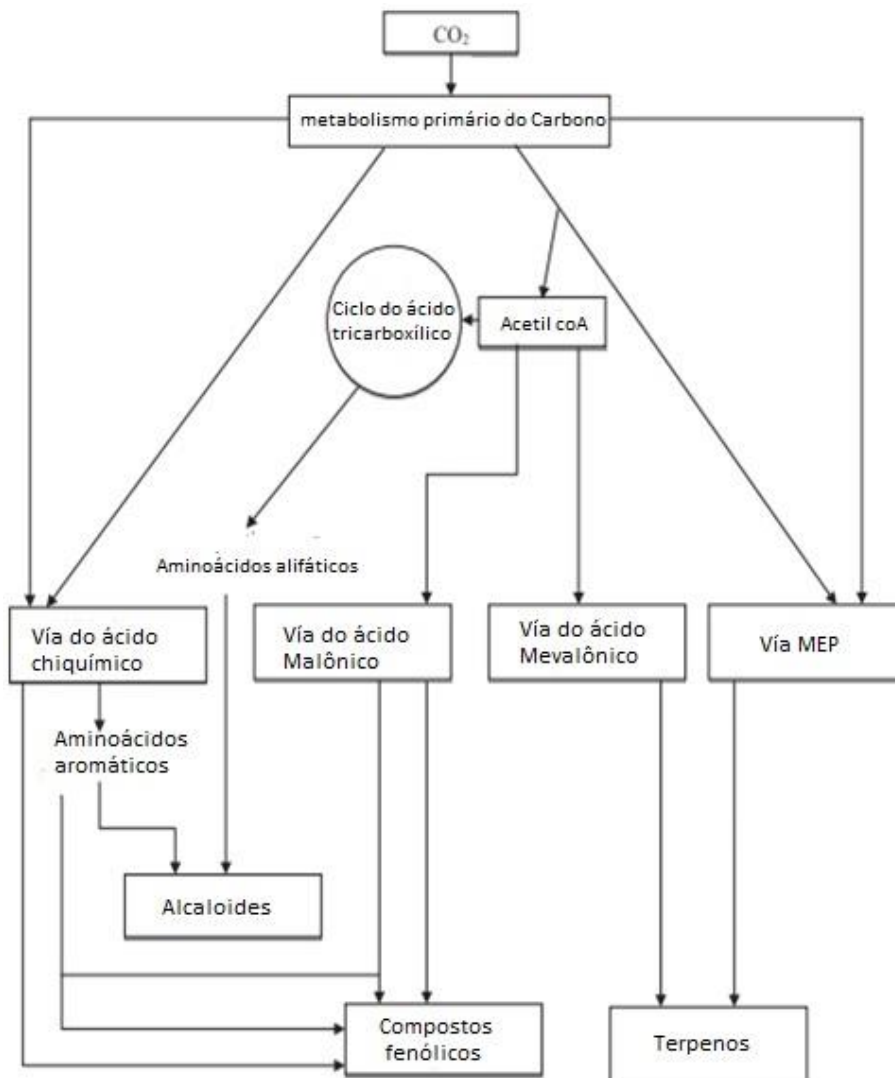
## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Compostos bioativos**

Os compostos bioativos são os metabolitos secundários que possuem propriedades farmacológicas ou toxicológicas sobre os sistemas biológicos nas pessoas e nos animais (BERNHOF, 2010), são biosintetizados por quatro vias principais, a via do ácido chiquímico, a via do ácido malônico, a via do ácido mevalônico e a via de não mevalonato (MEP). Os metabolitos secundários encontram-se principalmente em frutas, hortaliças e grãos; caracterizam-se por apresentar benefícios na saúde, como a melhora dos processos metabólicos, na capacidade antioxidante, ativação ou inibição de enzimas e da expressão gênica (AZMIR, ZAIDUL et al., 2013).

São classificados em três grupos, os terpenos e terpenoides, os alcaloides e os compostos fenólicos. Os terpenos são produzidos a partir da via do ácido mevalônico e da via do mevalonato; os alcaloides são sintetizados a partir dos aminoácidos aromáticos (provenientes da via do ácido chiquímico) e por aminoácidos alifáticos (provenientes do ciclo ácido tricarboxílico) e os compostos fenólicos são sintetizados através da via do ácido chiquímico e da via do ácido malônico (Figura 1) (CROTEAU et al., 2000).

**Figura 1.** Vias das biossínteses dos compostos bioativos.



Fonte. AZMIR, ZAIDUL et al. (2013).

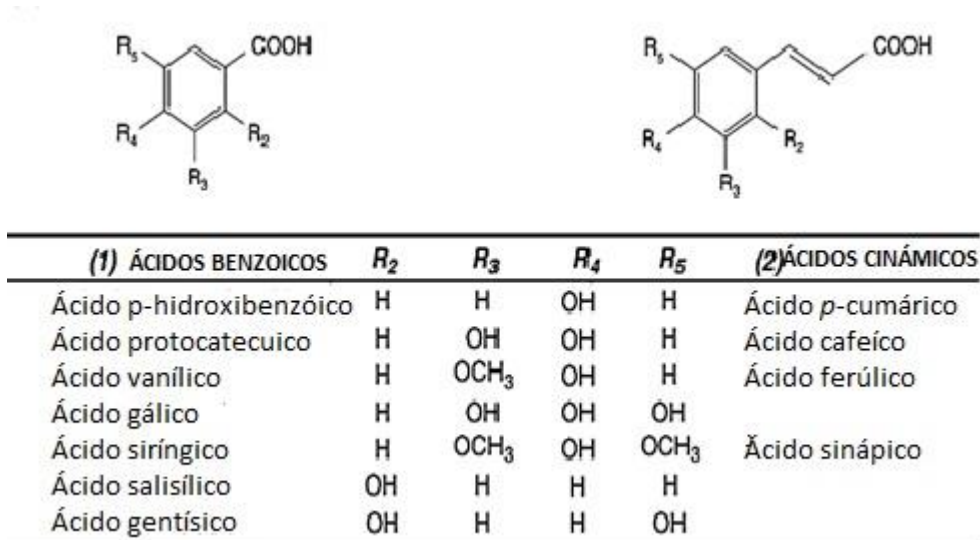
## 2.2. Compostos fenólicos

São conhecidos aproximadamente 8000 compostos fenólicos, dos quais estão classificados em compostos fenólicos simples y polifenóis. Os ácidos fenólicos e álcoois fenólicos estão dentro do grupo de fenólicos simples pois apresentam um fenol na sua estrutura; em quanto, que os polifenóis apresentam ao menos duas subunidades de fenol, encontrando-se os flavonoides, estilbenos e os compostos que apresentam três ou mais subunidades de fenol (D' ARCHIVIO, 2007; IGNAT et al., 2011; LEOPOLDINI et al., 2011).

Os compostos fenólicos são encontrados em frutas, legumes, flores, bebidas. Devido a sua estrutura apresentam capacidade antioxidante e tem sido encontrado que o aumento no seu consumo ajuda a reduzir doenças crônicas como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares. A estrutura dos compostos fenólicos determina sua atividade antioxidante, já que está relacionada com estrutura-atividade (SAMMAN et al., 2006; LEOPOLDINI et al., 2011; DALL & ARCHELA, 2014).

Os ácidos fenólicos, são caracterizados por apresentar um ácido carboxílico funcional no fenol; podem ser classificados em ácidos hidroxibenzóicos (AHB), cuja estrutura é C6-C1, encontram-se o ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecúico e o vanílico, em quanto que os ácidos hidroxicinâmicos (AHC) tem uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3), sendo os mais comuns o ácido ferúlico, cafeico e *p*-cumárico (Figura 2) (VAUZOUR et al., 2012; IGNAT et al., 2011; LEOPOLDINI et al., 2011).

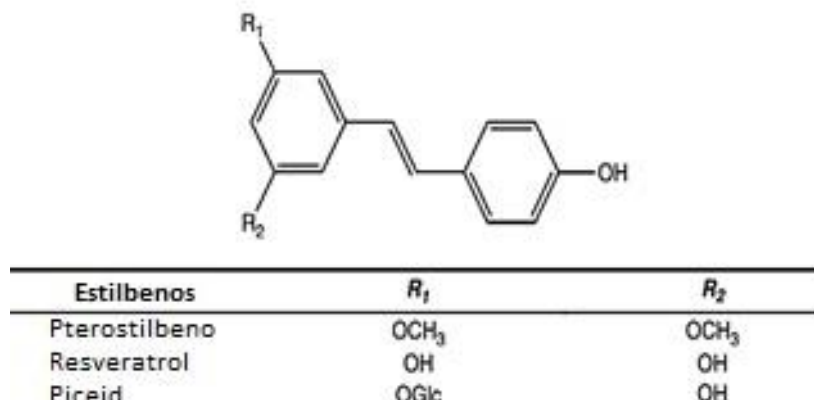
**Figura 2.** Estrutura dos ácidos fenólicos



Fonte. VAUZOUR et al., (2012)

Os estilbenos possuem uma estrutura C6-C2-C6 (Figura 3), nas plantas são produzidos em resposta a infecções de patógenos ou por condições de estresse, nos alimentos são encontrados em baixas quantidades, sendo o resveratrol, pterostilbeno e piceatonol os principalmente encontrados (VAUZOUR et al., 2012; IGNAT et al., 2011; LEOPOLDINI et al., 2011).

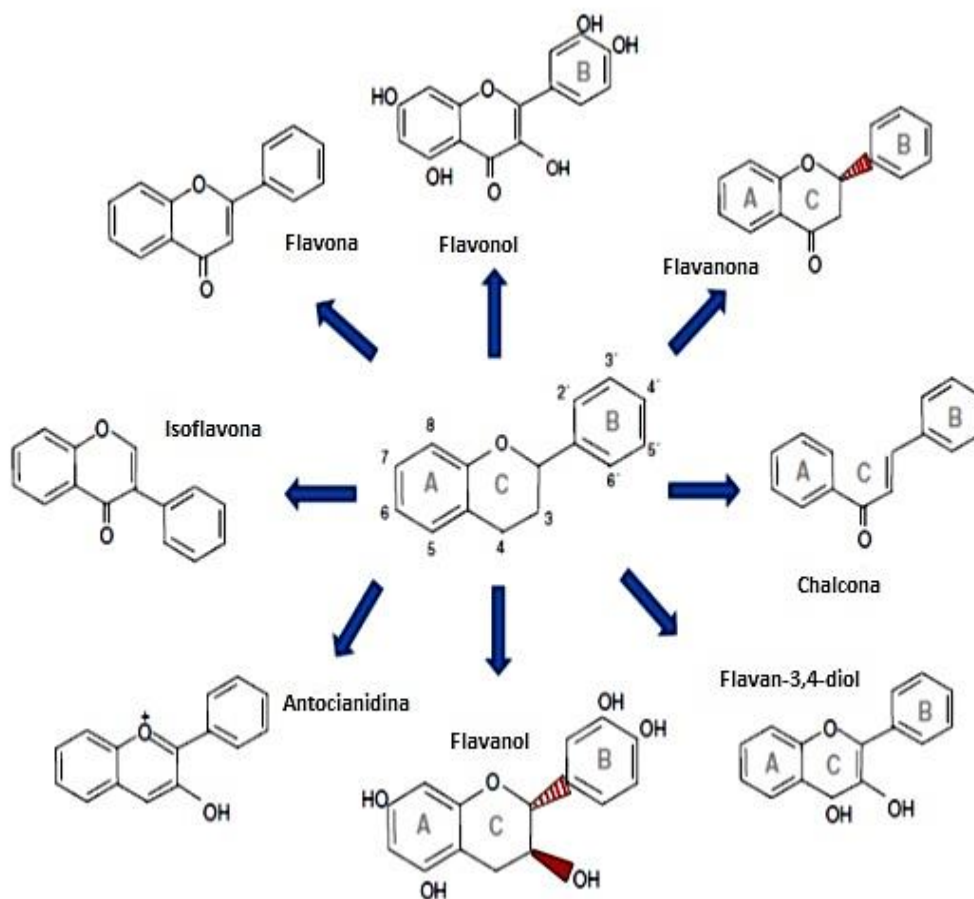
**Figura 3.** Estrutura dos estilbenos



Fonte. VAUZOUR et al. (2012).

Os flavonoides, são os compostos fenólicos de baixo peso molecular, que se encontram em grande abundancia nas plantas, se tem identificado perto de 4000 tipos de flavonoides, conhecidos por ter uma estrutura esquelética C6-C3-C6, sendo que na sua estrutura possui dois anéis fenólicos (A e B) que estão ligados por três átomos de carbono, formando um heterociclo oxigenado (anel C) (Figura 4) (ZHANG & TSAO, 2016; VAUZOUR et al., 2012; IGNAT et al., 2011; LEOPOLDINI et al., 2011), segundo o grau de oxidação no anel C, o padrão de hidroxilação do núcleo e o substituinte no carbono 3, são classificados em proantocianidina, antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonois e flavanois (Figura 4) (VAUZOUR et al., 2012; IGNAT et al., 2011; LEOPOLDINI et al., 2011). São os antioxidantes mais importantes devido a seu alto potencial redox, podem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singleto e tem um potencial quelante de metal (IGNAT et al., 2011).

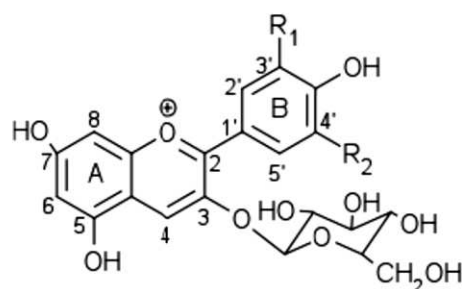
**Figura 4.** Estrutura dos principais flavonoides.



No centro a estrutura básica do flavonoide mostrando os anéis A, B e C e os números para as diferentes posições na estrutura flavan.  
Fonte: FRAGA & OTEIZA (2011).

As antocianidinas são a estrutura básica das antocianinas. As antocianidinas possuem um anel aromático A ligado a um anel heterocíclico C que contém oxigênio, e também está ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático B (Figura 5) (IGNAT et al., 2011). As antocianinas são pigmentos vacuolares encontrados em todos os tecidos vegetais, incluindo folhas, caules, raízes, flores e frutos e podem ser de cor vermelho, roxo ou azul, dependendo do pH. Se as antocianidinas estão glicosiladas (ligadas a um açúcar) forma as diferentes antocianinas dependendo o local da substituição glicosídica (Figura 6) (VAUZOUR et al., 2012).

**Figura 5.** Estrutura química das antocianidinas



Aglicona (antocianidina)	Substituição glicosídica (antocianina)		Acilação
Estrutura do anel B	Substituição nas posições 3 e 5		Esterificação das hidroxilas do açúcar
$R_1 = R_2 = H$	Pelargonidina	D-glicose	Ácidos sinâmicos
$R_1 = OH$ e $R_2 = H$	Cianidina	D-galactose	p-cumárico
$R_1 = R_2 = OH$	Delfinidina	D-xilose	Ferúlico
$R_1 = OCH_3$ e $R_2 = H$	Peonidina	L-ramnose	Caféico
$R_1 = OCH_3$ e $R_2 = OH$	Petunidina	L-arabinose	
$R_1 = R_2 = OCH_3$	Malvidina	Rutinose	Ácidos alifáticos
		Soforose	Acético
		Sambubiose	Malônico
		Gentiobiose	Succínico

Fonte: MALACRIDA & MOTA, (2006).

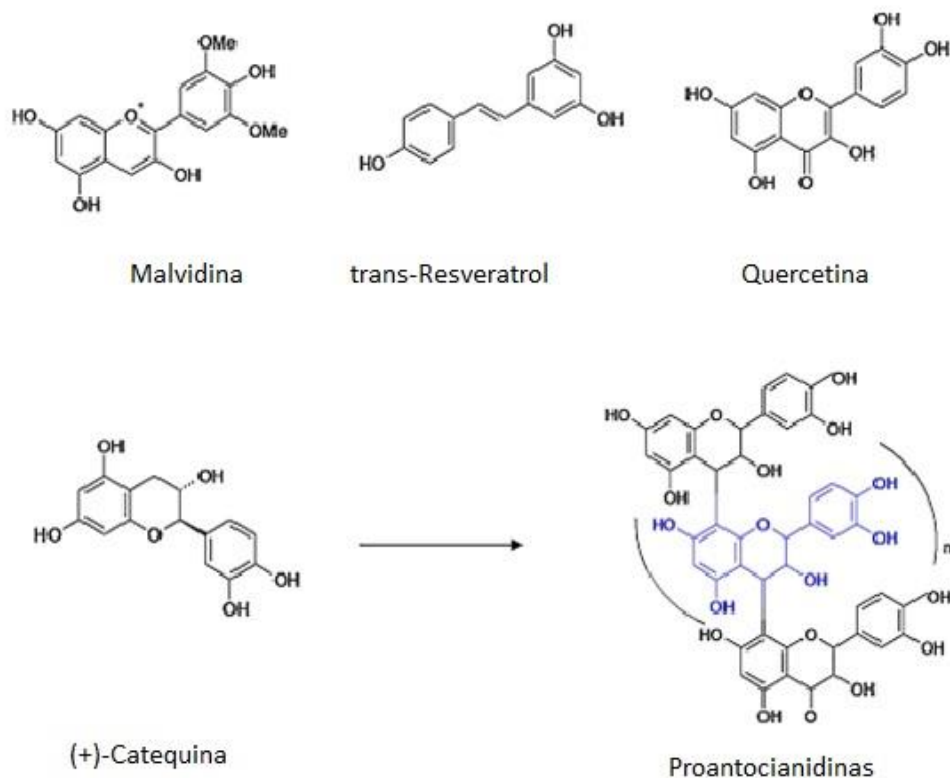
### 2.3. Compostos fenólicos no vinho tinto

Os vinhos tintos são conhecidos por ter alta quantidade de compostos fenólicos, os valores oscilam entre 1547 - 3418 mg GAE/L vinho (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2019); no entanto, as concentrações dos mesmos estão influenciadas pelo tipo de uva, o tipo de cultivo, as condições climáticas, pelo tipo de fermentação e o envelhecimento (CARNEIRO et al., 2020; PLAVŠA, et al., 2012; OLIVEIRA, et al., 2012).

Os principais compostos fenólicos encontrados no vinho tinto são as antocianinas, o ácido ferúlico, ácido gálico, estilbenos, resveratrol e quercetina (Figura 7) (DALL & ARCHELA, 2014). A antocianina é o mais importante, pois é o encarregado de dar a coloração vermelha e contribui em grande maneira na capacidade antioxidante dos vinhos, seu teor varia entre 186 - 561 mg Mlve/L

vinho (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2019), no entanto, a concentração das antocianinas diminui ao longo do tempo, o Gutierrez et al., (2005) reportaram que o teor de antocianinas diminuiu a partir dos três meses de envelhecimento nos vinhos tintos *Cabernet sauvignon*, *Cencibel* e *Syrah*. A formação dos aldeídos contribui nas transformações químicas que induz na mudança de sabor e color do vinho tinto durante o envelhecimento (OLIVEIRA et al., 2011).

**Figura 7.** Compostos fenólicos encontrados no vinho tinto.



Fonte. IRITI & VARONI (2014).

O Brasil tem se destacado nos últimos anos como produtor de vinhos tintos finos de boa qualidade. No Sul do país, tem se concentrado a produção vinífera brasileira, devido às condições favoráveis do clima (WÜRZ et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2012). No estudo do Würz et al., (2019) encontraram que a maior concentração de antocianinas é favorecida no uso de sistemas de cortina dupla (GDC) e em latada no cultivo de uvas viníferas da variedade *Cabernet sauvignon*. No entanto, Carneiro et al., (2020) reportaram que nos vinhos brasileiros produzidos na Região do Vale do São Francisco, apresentam maior teor de quercetina, o ácido vanílico e o ácido elágico.

Os vinhos tintos no Brasil apresentam teores de compostos fenólicos entre 1041.63 e 1958.78 mg GAE/L, e com valores de antocianinas entre 9.35 e 237.31 mg L<sup>-1</sup>, (GRANATO et al., 2010) e em vinhos de países como USA, França, Espanha, Chile e Itália encontraram que a concentração de compostos fenólicos varia entre 795 - 3448 mg GAE/L vinho e das antocianinas varia entre 301 e 682 mg L<sup>-1</sup> vinho (DI MAJO et al., 2008; KONDRASHOV et al., 2009; CHIRA et al., 2011; FANZONE et al., 2012).

#### **2.4. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos**

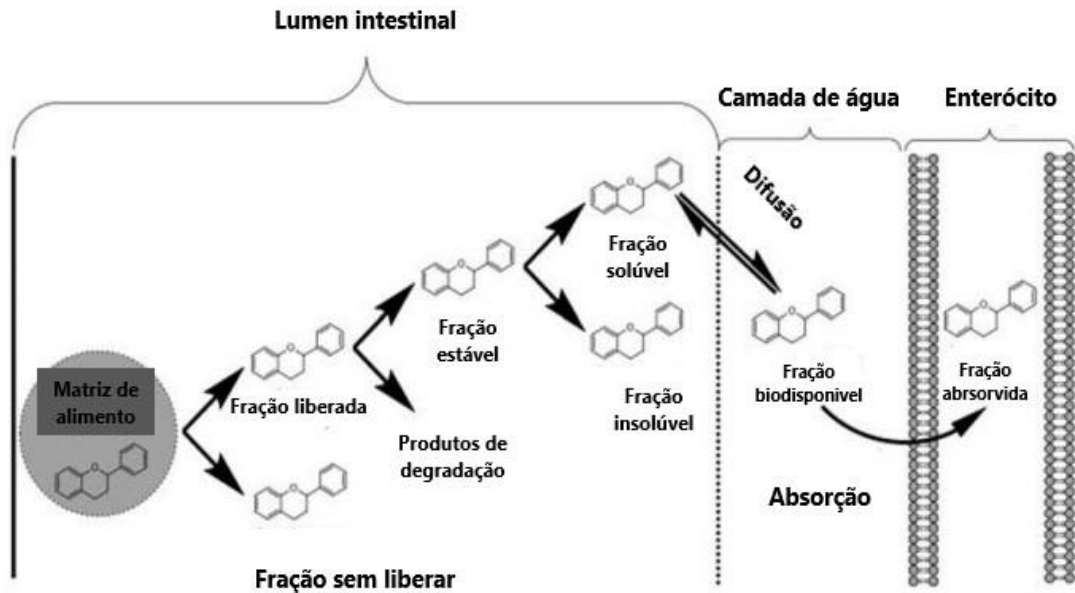
Os benefícios dos compostos fenólicos no organismo dependem da biodisponibilidade deles no sistema digestivo e sistema circulatório. A biodisponibilidade é a quantidade de nutriente que é digerido, absorvido e metabolizado no organismo. Não obstante, depende de diferentes fatores que vão contribuir ou diminuir o teor dos compostos. Os fatores ambientais podem ser as condições climáticas, o grau de maturação dos alimentos, os tipos de cultura, assim como os fatores relacionados aos tipos de processamento dos alimentos, os fatores intestinais (atividade enzimática) e os fatores sistêmicos; a interação dos componentes com a matriz alimentar e, principalmente a estrutura química dos compostos, pois se são compostos gliconados devem ser hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais que irão facilitar a absorção (D'ARCHIVIO et al., 2010; NEILSON, GOODRICH & FERRUZZI, 2017).

Depois da ingestão mediante a mastigação e trituração dos alimentos, os compostos fenólicos são liberados da matriz alimentar, continuando no estômago e no intestino delgado pela ação das enzimas gastrointestinais, liberam os compostos fenólicos, permitindo a difusão através da camada superficial dos enterócitos e disponibilizando para a absorção. Apresenta-se variação na concentração dos compostos fenólicos, pois são afetados pela degradação das enzimas, mudanças de pH, embora eles devem ser solúveis para facilitar a difusão através dos enterócitos (Figura 8) (NEILSON, GOODRICH & FERRUZZI, 2017).

Os compostos fenólicos no organismo são considerados xenobióticos, ativando o sistema de desintoxicação no fígado, diminuindo a toxicidade e metabolizando-os para que sejam excretados. O sistema de desintoxicação consiste em três fases

de metabolismo. O metabolismo fase I, ocorre a hidroxilação dos compostos pela atividade do citocromo P450 (CYP) (NEILSON, GOODRICH & FERRUZZI, 2017).

**Figura 8.** Processos digestivos e de absorção envolvidos na biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

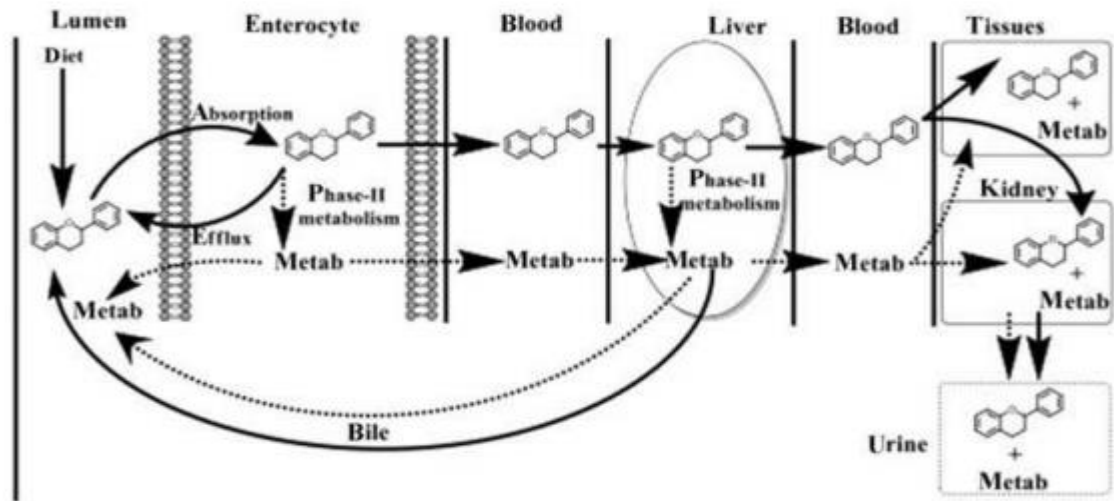


Fonte. Neilson, Goodrich & Ferruzzi (2017).

No metabolismo fase II, se dá o processo de conjugação mediante a sulfatação, glucoconorização e metilação num grupo hidroxila do xenobióticos. A glucuronidação é realizada pela ação da uridina difosfato glucuronil-transferase (UDPGT), a sulfatação pela ação da sulfotransferase (SULT) ou fenol-sulfotransferase (PST) e a O-metilação é realizada por catecol O-metil transferase (COMT) (Figura 9). Os produtos gerados são menos tóxicos e podem ser excretados na bile ou urina (NEILSON, GOODRICH & FERRUZZI, 2017).

O metabolismo fase III, os compostos fenólicos conjugados na fase II são transportados para a corrente sanguínea e para o fígado, os compostos que não são absorvidos são excretados, no entanto, os compostos excretados podem ser reabsorvidos pelos intestinos, ação que é denominada como reciclagem enterohepática (Figura 9) (NEILSON, GOODRICH & FERRUZZI, 2017).

**Figura 9.** Esquema dos processos que afetam a biodisponibilidade sistêmica e o metabolismo dos fenóis na dieta.



Fonte: Neilson, Goodrich & Ferruzzi (2017).

## 2.5. Dislipidemia

A dislipidemia ou hiperlipidemia é produzida pelas alterações dos níveis dos lipídios no sangue principalmente do colesterol, seu aumento favorece o desenvolvimento da placa de ateroma no interior das artérias, o qual é uma das principais causas da aterosclerose, doença coronariana, doença cerebrovascular isquêmica e doença vascular periférica. (SOCA 2009; JAIN et al., 2007).

## 2.6. Classificação de lipoproteínas

As lipoproteínas são compostas por lipídios e proteínas, denominadas apoproteínas (apo), sua função é transportar lipídios no plasma; tornar as lipoproteínas solúveis no plasma e, assim, agir como interface entre o plasma e os componentes principais (JAIN et al., 2007). São divididas em classes, que se diferenciam pelo tamanho, pela densidade e pela composição tanto lipídica como apoprotéica: Qm (quilomícrons), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (FORTI & DIAMENT, 2006).

O HDL, é constituído por 50 % de apoproteínas (AI em maior quantidade, AII, CI, CII, CIII, E e J), 20 % de colesterol livre (CL) e de colesterol esterificado (CE), 15 % de fosfolípidos e 5 % de triglicéridos (TG). Sua função principal é o transporte reverso de colesterol, atua como antioxidante, anti-inflamatório, antiagregante plaquetário, anticoagulante, pró-fibrinolítico e de proteção endotelial (FORTI & DIAMENT, 2006).

## 2.7. Colesterol

O colesterol apresenta diversas funções no organismo, é um componente da membrana celular, é o precursor nas sínteses dos ácidos biliares e ajuda como precursor dos esteroides, incluindo hormônios sexuais, glicocorticoides e mineralocorticoides e na produção da vitamina D, a partir do 7-desidrocolesterol (CHEN et al., 2011).

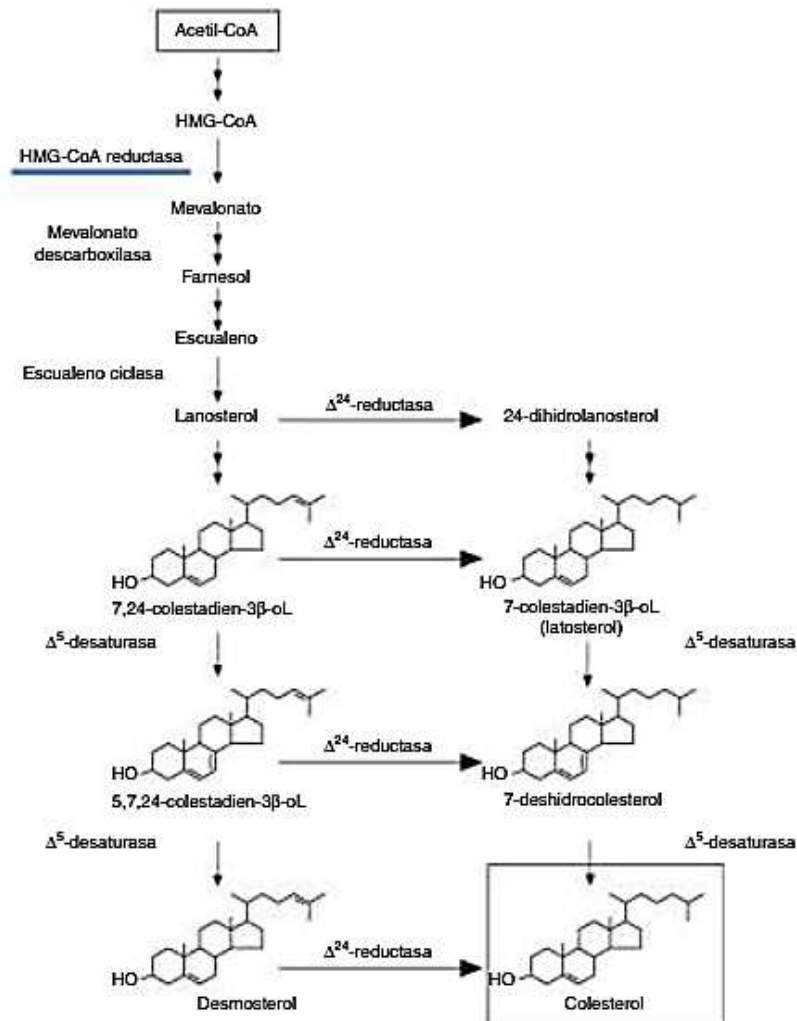
O metabolismo do colesterol ocorre por meio de dois processos importantes, a via exógena e a via endógena. Na via exógena, é através da absorção intestinal, na qual a lipase hidrolisa os ésteres de colesterol, facilitando a entrada do colesterol na membrana plasmática do enterócito. Pela ação da acil CoA-colesterol aciltransferase-2 (ACAT-2), esse colesterol é reesterificado e é incorporado aos quilomícrons em associação com os triglicéridos (TG) e a apoproteína B-48, para serem secretado no sangue (BOIX & PICÓ 2005).

No fígado é realizada a síntese do colesterol pela via endógena (Figura 10), a través do acetil coA e a ação da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA), onde o colesterol formado é posteriormente liberado no plasma em forma de VLDL e pela ação da lipase forma-se o LDL, esse LDL pode ser captado pelos receptores LRP do fígado ou podem ser convertidos em LDL pela ação da lipase hepática. Os LDL são captados pelos receptores LDL hepáticos ou subministrados aos tecidos periféricos. Em quanto que o LDL oxidado é captado pelos receptores dos macrófagos, formando posteriormente as células espumosas para dar origem à formação da placa de ateroma (BOIX & PICO, 2005).

Por tanto, para manter a homeostase entre a via endógena e a via exógena, a atividade da HMG-CoA aumenta o diminui, quando o nível do colesterol é baixo, sua atividade aumenta, em quanto que sua atividade é inibida quando o colesterol

proveniente do intestino é maior, reduzindo dessa maneira a síntese do colesterol hepático.

**Figura 10.** Sínteses de colesterol endógeno.



Fonte. Zárate et al., (2016).

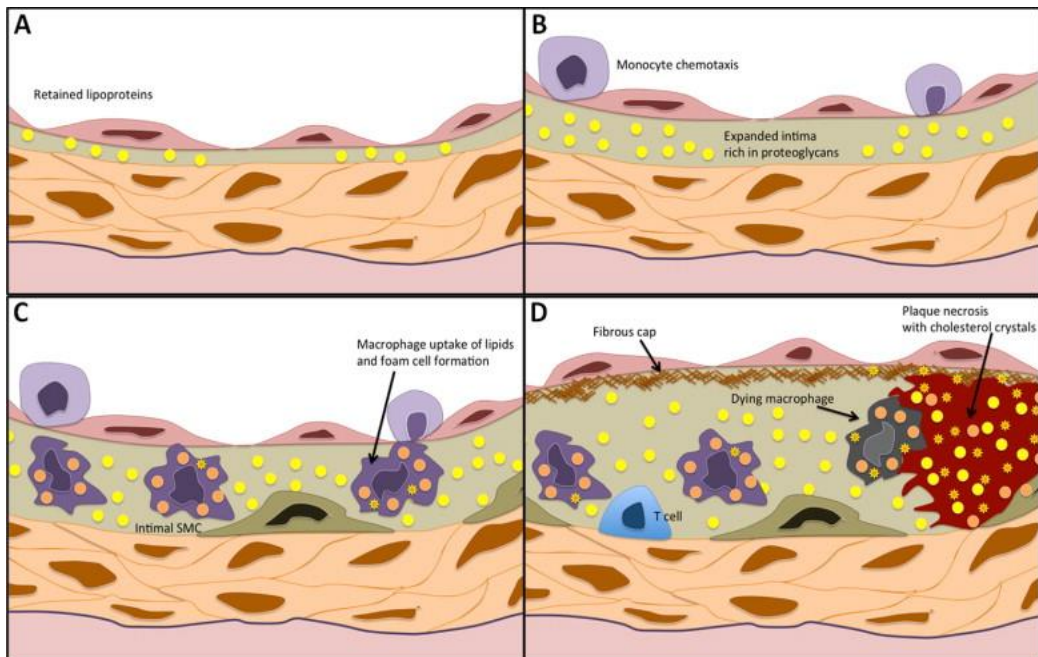
## 2.8. Aterosclerose

A aterosclerose é a denominação do processo crônico fisiopatológico, caracterizado pela agregação de colesterol, infiltração de macrófagos e proliferação de células musculares lisas (SMCs), levando à formação de trombos (LEIVA et al., 2015). A progressão da aterogênese ocorre em diferentes fases em condições hipercolesterolêmicas ou em reações inflamatórias na ausência da hipercolesterolemia. A primeira fase, ocorre com a acumulação e oxidação do

LDL (LDL<sub>ox</sub>) na túnica íntima, provocando a deformação das células endoteliais, além disso, a inflamação na parede do vaso, induz a expressão das moléculas de adesão celular (ICAM-1), moléculas de adesão de células vasculares, selectinas, integrinas e outros, e a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interferons (IFNs), proteína quimioatraente de monócitos-1, fator-1 derivado de células estromais, proteína-1 inflamatória de macrófagos e outros (Figura 12A) (KIERSZENBAUM, 2012; SIMIONESCU & SIMA 2012; WONG et al., 2012).

Na etapa dois (Figura 12B), o LDL induz o processo inflamatório ao estimular as células endoteliais a liberar as proteínas quimiotáticas para facilitar a entrada dos monócitos na íntima do vaso sanguíneo por meio da diapedese, convertendo-se em macrófagos. (KIERSZENBAUM, 2012; SIMIONESCU & SIMA 2012; WONG et al., 2012). De igual maneira, a camada íntima se expande, juntamente com mudanças na composição da matriz extracelular, incluindo proteoglicanos ricos em glicosaminoglicanos que têm alta afinidade para a apolipoproteína B. Na etapa três, os macrófagos são os encarregados de coletar o LDL<sub>ox</sub>, transformando-se em células espumosas como resultado da absorção do colesterol; nessa etapa também começa a formação da placa fibrosa devido à entrada das células musculares lisas na túnica íntima (Figura 12C) (WONG et al., 2012). Na etapa quatro, a acumulação do colesterol induz o processo apoptótico das células espumosas, resultando na formação dos cristais de colesterol, que podem ser encontrados dentro do núcleo necrótico rico em lipídios, mas também em áreas subendoteliais intra e extracelularmente (Figura 12D). Na formação dos cristais de colesterol pode resultar em expansões de volume que levam à ruptura da placa (WONG et al., 2012).

**Figura 11.** Progressão da aterosclerose e formação da placa de ateroma



A. Etapa 1. Acumulação de lipoproteínas na túnica íntima. B. Etapa 2. Quimiotaxia de monócitos em resposta às LDL oxidada e deformação da túnica íntima. C. Etapa 3. Formação de células espumosas. D. Etapa 4. Formação de cristais de colesterol e liberação de conteúdo intracelular e expansão do núcleo necrótico devido à morte de macrófagos.

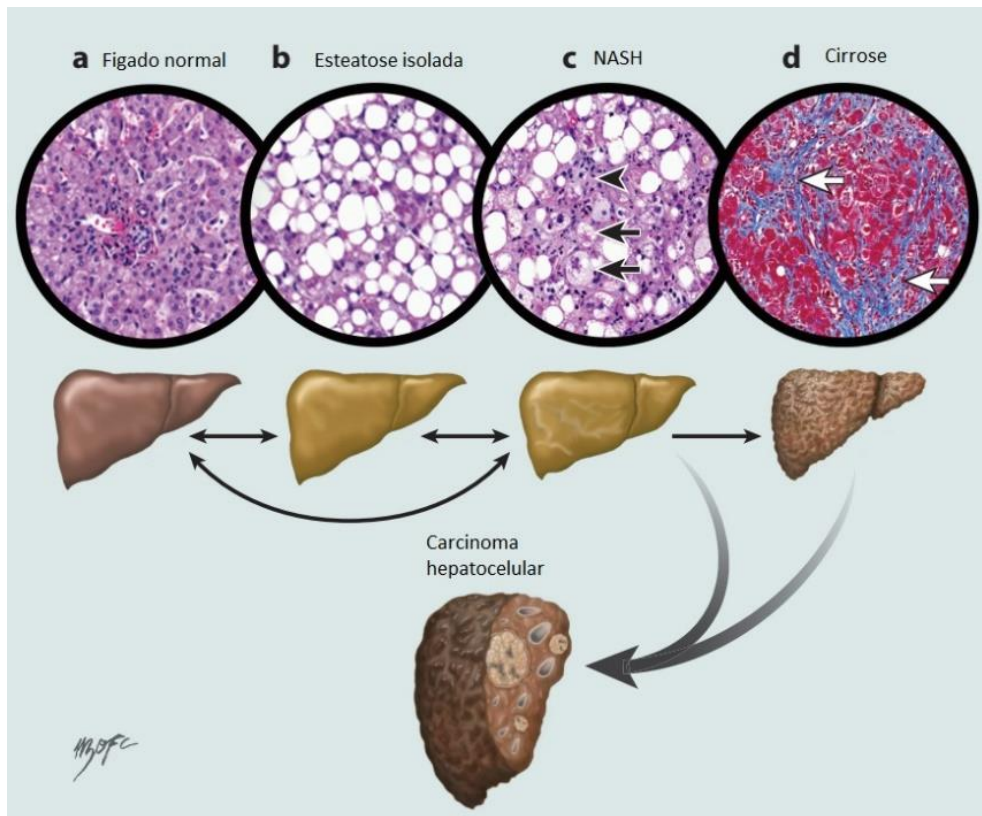
Fonte. WONG et al., (2012).

## 2.9. Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A DHGNA é denominada para as alterações histopatológicas do fígado, caracteriza-se pela deposição do colesterol nos hepatócitos e ativação dos mecanismos determinantes nas alterações necro-inflamatórias e fibróticas, que podem direcionar a esteatose hepática simple ou esteatose hepática com o sem fibrose (NASH) que pode progredir a cirrose e até carcinoma hepatocelular (Figura 12) (ARAB et al., 2018; ARGUELLO et al., 2015).

O desenvolvimento da NAFLD está relacionado com a síndrome metabólica, à obesidade, fatores genéticos e epigenéticos, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia, sendo atualmente reconhecida por ser a doença hepática que mais afeta a população em uma faixa de 25 -30 % da população mundial (ARGUELLO et al., 2015), pois os estilos de vida sedentário e a obesidade têm se tornado fatores importantes para desenvolver esse tipo de doença.

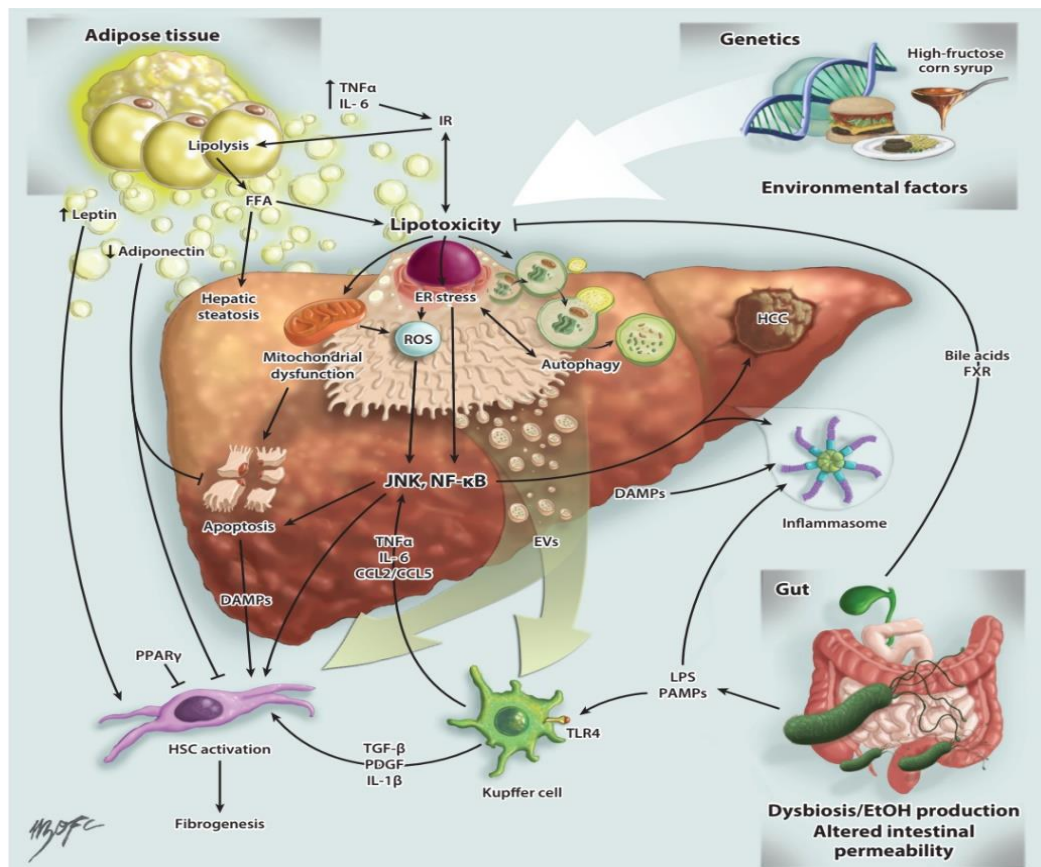
**Figura 12.** Evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)



A. Fígado normal. B. Esteatose isolada. C. NASH. D. Cirrose.  
Fonte. ARAB et al., (2018).

O consumo de alimentos ricos em lipídios, junto com os fatores genéticos, influencia no acúmulo de lipídios no tecido hepático, favorecendo o desenvolvimento da esteatose. O influxo excessivo de ácidos graxos, que induz a peroxidação lipídica e a lipotoxicidade, sobrecarregando a mitocôndria com produtos oxidados, principalmente EROS, ativando os mediadores pro apoptóticos (JNK, NF- $\kappa$ B), assim também, as células kupffer liberam os mediadores pro inflamatórios (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) e as células estreladas promovem a fibrogênese, a continuação dessas ações ajudam na progressão da NASH e que posteriormente pode desenvolver até carcinoma hepatocelular (Figura 13) (ARAB et al., 2018; ARGUELLO et al., 2015).

**Figura 13.** Doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD)



A. Fígado normal. B. Esteatose isolada. C. NASH. D. Cirrose.  
 Fonte: ARAB et al., (2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do consumo de vinho tinto *Cabernet Sauvignon* com e sem álcool no dano hepático e na formação da placa de aterosclerose em coelhos de raça Nova Zelândia com hipercolesterolemia induzida.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar os perfis lipídicos do plasma sanguíneo e os biomarcadores de estresse oxidativo no tecido hepático e aórtico dos coelhos avaliados;
- Determinar os efeitos das diferentes doses de álcool de vinho tinto e da sinvastatina nos tecidos do fígado, e na formação da placa aterosclerótica;
- Avaliar histológica e morfológicamente os efeitos causados pelas diferentes concentrações de álcool do vinho tinto no fígado e na aorta torácica dos coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOSTOLIDOU, C. et al. Cardiovascular risk and benefits from antioxidant dietary intervention with red wine in asymptomatic hypercholesterolemics. **Clinical Nutrition ESPEN**, 10 (6), e224–e233, 2015.

ARAB, J.P., ARRESE, M. & TRAUNER, M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 13, 321-350, 2018.

ARENDET, B. M. et al. Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: A randomized controlled trial (ISRCTN68505294). **Nutrition Journal**, 4, 1–11, 2005.

ARGUELLO, G., BALBOA, E., ARRESE, M., & ZANLUNGO, S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1852(9), 1765-1778, 2015.

AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.A.N. & Omar, A.K.M. et. al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. 117, 426–436, 2013.

BELTOWSKI, J.; WOJCICKA, G.; JAMROZ-WISNIEWSKA, A. Adverse Effects of Statins - Mechanisms and Consequences. **Current Drug Safety**, 4(3), 209–228, 2009.

BERNHOF, A. A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway, 2010.

BIRBEN, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, 5(1), 9–19, jan. 2012.

BOEING, H. et al. Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of

chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51(6), 637–663, 2012.

BOIX, E., & PICÒ, A. M. Cholesterol absorption inhibitors. *Endocrinología y Nutrición*. 52(6), 297-308, 2005.

CARNEIRO, C. N.; GOMEZ, F. J.; SPISSO, A.; SILVA, M. F.; AZCARATE, S. M.; & DIAS, F. D. S. Geographical characterization of South America wines based on their phenolic and melatonin composition: an exploratory analysis. *Microchemical Journal*, 158, 105240, 2020.

CHEN, Z.Y., MA, K.Y., LIANG, Y., PENG, C. & ZUO, Y. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 61-69, 2011.

CHIRA, K.; PACELLA, N.; JOURDES, M.; TEISSEDE, P.L. Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*. 126(4), 1971–1977, 2011.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists*, Rockville, MD, pp. 1250–1318, 2000.

DALL, L.H. & ARCHELA, E. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 34(2), pp.193-210, 2014.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; & MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348, 2007.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARÌ, R.; SCAZZOCCHIO, B. & MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1321–1342, 2010. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>

DI MAJO, D.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; LA NEVE, L.; GIAMMANCO, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*. 111 (1), 45–49, 2008.

- FANZONE, M.; ZAMORA, F.; JOFRE, V.; ASSOOF, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; PEÑA-NEIRA, A. Phenolic characterization of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(3), 704–718, 2012.
- FORTI, N. AND DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 87(5), 671-679, 2006.
- FRAGA, C. G. & OTEIZA, P. I. Dietary flavonoids: role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51 (4), 813- 823, 2011.
- GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; CHIRA, K.; MIRAMONT, C.; ESCUDIER, J. L.; SAMSON, A.; SALMON, J. M.; OJEDA, H.; & TEISSEDE, P. L. Disease Resistant Bouquet Vine Varieties: Assessment of the Phenolic, Aromatic, and Sensory Potential of Their Wines. *Biomolecules*, 9(12), 793, 2019.
- GRANATO, D., KATAYAMA, F. C. U., & CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1542-1549, 2010.
- GUTIÉRREZ, I. H., LORENZO, E. S. P., & ESPINOSA, A. V. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92(2), 269-283, 2005.
- HASEEB, S.; ALEXANDER, B.; BARANCHUK, A. Wine and Cardiovascular Health. *Circulation*, 136(15), 1434–1448, 2017.
- IGNAT, I., VOLF, I. & POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835, 2011.

IRITI, M., VARONI, E.M. Cardioprotective effects of moderate red wine consumption: Polyphenols vs. ethanol. *Journal for Applied Biomedicine*. 12(4), 193-202, 2014.

JAIN, K.S., KATHIRAVAN, M.K., SOMANI, R.S. AND SHISHOO. C.J. The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(14), pp.4674-4699, 2007.

KIERSZENBAUM, A., L. Capítulo 12. SISTEMA CARDIOVASCULAR. Em *Histologia e Biologia celular, uma introdução à patologia*, pp. 379-380, 2012.

KISHIMOTO, Y.; TANI, M.; KONDO, K. Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), p. 532–535, 13 maio 2013.

KONDRASHOV, A., ŠEVČÍK, R., BENÁKOVÁ, H., KOŠTÍŘOVÁ, M., & ŠTÍPEK, S. The key role of grape variety for antioxidant capacity of red wines. e-SPEN. *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 4(1), e41-e46, 2009.

LEOPOLDINI, M., RUSSO, N. & TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306, 2011.

LEIVA, E., WEHINGER, S., GUZMÁN, L., & ORREGO, R. Capítulo 3. Role of Oxidized LDL. In Atherosclerosis. **Hypercholesterolemia**. InTech, 2015.

LIPPI, G., FRANCHINI, M., FAVALORO, E. J., & TARGHER, G. "Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the “French paradox”. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 31(1), 059-070. © Thieme Medical Publishers, 2010.

MAHMOUDI, M. The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine (United Kingdom)*, 46(9), 505–508, 2018.

MALACRIDA, C.R. & MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 24(1), 59-82, 2006.

- NEILSON, A. P., GOODRICH, K. M., & FERRUZZI, M. G. Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods. In **Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease**, pp. 301-319, 2017. Academic Press.
- NOGUER, M. A.; CERESO, A. B.; NAVARRO, E. D. & GARCIA-PARRILLA, M. C. Intake of alcohol-free red wine modulates antioxidant enzyme activities in a human intervention study. *Pharmacological Research*, 65(6), 609–614, 2012.
- OLIVEIRA, C. M., FERREIRA, A. C. S., DE FREITAS, V., & SILVA, A. M. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115-1126, 2011.
- OLIVEIRA, L., BARCELLOS, A., SOUZA, B., & DRUZIAN, J. Atividade antioxidante de compostos fenólicos em vinhos tintos: busca em bases científicas e tecnológicas. Congresso brasileiro de prospecção tecnológica (ProspeCT&I). 5(4), p. 221-228, 2012.
- PLAVŠA, T., JURINJAK, N., ANTUNOVIĆ, D., PERŠURIĆ, Đ., & KOVAČEVIĆ GANIĆ, K. The influence of skin maceration time on the phenolic composition and antioxidant activity of red wine Teran (*Vitis vinifera* L.). *Food Technology and Biotechnology*, 50(2), 152-158, 2012.
- SAMMAN, S., BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99, 191-203. 2006.
- SCHRIEKS, I. C.; VAN DEN BERG, R.; SIERKSMA, A.; BEULENS, J.W.; VAES, W.H. & HENDRIKS, H. Effect of red wine consumption on biomarkers of oxidative stress. *Alcohol and Alcoholism*, 48(2), 153–159, 2013.
- SIMIONESCU, M. & SIMA, A. V. Morphology of atherosclerotic lesions. Inflammation and Atherosclerosis, G. Wick and C. Grundtman, Eds., pp. 19–37, Springer, Vienna, Austria, 2012.
- SOCA, P. E. M. Dyslipidemias. *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud (ACIMED)*. 20 (6), p. 265-273, 2009.

- VAUZOUR, D.; VAFEIADOU, K. & SPENCER, J. P. E. Capítulo 4. Polyphenols. *Phytonutrients*. pp. 110-145, 2012.
- WARD, N. C.; WATTS, G. F.; ECKEL, R. H. Statin Toxicity. *Circulation Research*, 124(2), 328–350, 2019.
- WONG, B. W., MEREDITH, A., LIN, D., & MCMANUS, B. M. The biological role of inflammation in atherosclerosis. *Canadian Journal of Cardiology*, 28(6), 631-641, 2012.
- WÜRZ, D. A., DE BEM, B. P., ALLEBRANDT, R., BONIN, B., DALMOLIN, L. G., CANOSSA, A. T., RUFATO, L., & KRETZSCHMAR, A. A. New wine-growing regions of Brazil and their importance in the evolution of Brazilian wine. *BIO Web of Conferences*, 9, p. 01025, 2017. EDP Sciences.
- WÜRZ, D. A., MARCON FILHO, J. L., ALLEBRANDT, R., DE BEM, B. P., RUFATO, L., & KRETZSCHMAR, A. A. Desempenho agrônomo da videira Cabernet Sauvignon em diferentes sistemas de condução em regiões de elevada altitude de Santa Catarina, Brasil. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 18(1), 73-80, 2019.
- YOSHIDA, H.; KISUGI, R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clínica Chimica Acta*, 411(23–24), 1875–1882, 2010.
- ZÁRATE, A., MANUEL-APOLINAR, L., BASURTO, L., DE LA CHESNAYE, E., & SALDÍVAR, I. Colesterol y aterosclerosis. Consideraciones históricas y tratamiento. *Archivos de cardiología de México*, 86(2), 163-169, 2016.
- ZHANG, H., & TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42, 2016.

**ARTIGO I. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CONSUMO DO VINHO TINTO  
*Cabernet Sauvignon* COM E SEM ÁLCOOL NA AORTA DE COELHOS  
HIPERCOLESTEROLÊMICOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA**

## Resumo

O consumo do vinho tinto tem aumentado nos últimos anos devido aos benefícios que apresenta à saúde, principalmente na redução de doenças cardiovasculares. No entanto, ainda não está claro se o benefício do vinho tinto é pelo teor dos compostos bioativos ou ao teor alcoólico. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito ateroprotetor do vinho tinto *Cabernet sauvignon*, em diferentes dosagens de álcool (13 %, 8 % e 4 %) e vinho tinto sem álcool em coelhos hipercolesterolêmicos. Foram utilizados 30 coelhos machos da raça Nova Zelândia, divididos em seis grupos que receberam: ração hipercolesterolêmica; ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia<sup>-1</sup>; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool. Foram determinados os níveis plasmáticos de colesterol total (Ct), colesterol LDL (LDL-c), colesterol HDL (HDL-c), triglicérides (TG) e, no tecido aórtico foram avaliados os biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e proteínas carboniladas) e as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST. As análises histológicas foram realizadas no tecido da aorta torácica, identificando a formação da placa aterosclerótica. Os resultados mostraram que o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica e o vinho tinto, aumentaram os níveis plasmáticos de Ct, LDL-c, sem afetar os níveis de HDL-c. Foi demonstrado pela primeira vez que o consumo de vinho tinto 13 % e 8 % aumentaram os níveis da atividade da GST, atenuando a peroxidação lipídica no tecido aórtico e foi evidenciado, nos cortes histológicos, que tanto o vinho tinto com e sem álcool favoreceram à redução da formação da placa de ateroma nos coelhos hipercolesterolêmicos, obtendo resultados tão eficiente quanto o reportado para a sinvastatina.

**Palavras-chave:** Vinho tinto; vinho tinto sem álcool; estresse oxidativo; proteína carbonilada; aorta.

### **Highlights**

- O consumo do vinho tinto com 13 % e com 8 % de álcool elevou a atividade da enzima GST em coelhos hipercolesterolêmicos.
- Os vinhos tintos com e sem álcool atenuaram a produção de proteínas carboniladas em coelhos hipercolesterolêmicos.
- O vinho tinto atenuou a progressão da placa de ateroma.
- Os efeitos benéficos do vinho tinto, podem estar relacionados à ação conjunta entre o álcool e os fenólicos presentes.

## 1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo acúmulo de lipídios e células inflamatórias na túnica íntima da aorta, que culmina com a formação da placa de ateroma (LEIVA et al., 2015; VILAHUR; BADIMON, 2013), a qual é considerada atualmente como a principal causa das doenças cardiovasculares, incluindo a cardiopatia coronária, doenças cerebrovasculares e trombozes, que segundo a Organização Mundial da Saúde, no ano 2017, aproximadamente 17,7 milhões de pessoas morreram devido a doenças cardiovasculares (DCV) (WHO, 2019).

A hipercolesterolemia é o aumento excessivo do colesterol principalmente das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) no plasma sanguíneo, que junto com o estresse oxidativo gerado pelo excesso de radicais livres no organismo estão relacionados com o desenvolvimento da aterosclerose, pois participam da oxidação do LDL-c gerando a formação da placa de ateroma (LEIVA et al., 2015).

As estatinas são fármacos utilizados para reduzir os níveis plasmáticos de colesterol, mediante a inibição da enzima 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG CoA redutase). Porém, tem-se evidenciado efeitos secundários no seu consumo, como desenvolvimento de doenças como miopatias, hepatotoxicidade, rabdomiólise e problemas neurocognitivos (THOMPSON et al., 2016; WARD; WATTS; ECKEL, 2019). Da mesma maneira tem-se procurado alternativas diferentes aos medicamentos que favoreçam a saúde.

O consumo do vinho tinto poderia ser uma alternativa para diminuir o risco de apresentar uma doença cardiovascular, pois a partir do reportado pelo *paradoxo francês*, que indica que o consumo moderado de vinho tinto favorece nos baixos índices de mortes relacionados com doenças coronárias nos franceses apesar de ter uma dieta rica em lipídios (RENAUD & DE LORGERIL, 1992).

Os benefícios do vinho tinto estão relacionados com o alto teor de compostos bioativos como os ácidos hidroxicinâmicos e os flavonoides (HASEEB; ALEXANDER; BARANCHUK, 2017). No entanto, ainda não está claro se as vantagens do seu consumo são resultado da presença do etanol, dos compostos fenólicos ou da ação conjunta deles. Nogueira et al., (2012) reportou que os benefícios do vinho tinto são devido ao teor de compostos fenólicos presentes, da mesma forma o Serafini; Maiani; Ferro-Luzzi, (1998) reportaram que o vinho tinto

sem álcool aumentou a capacidade antioxidante no plasma depois de 50 minutos de ingestão. Não obstante, outros estudos demonstraram que o consumo de vinho tinto aumentou a capacidade antioxidante no plasma sanguíneo (SCHRIEKS et al., 2013), e Arendt et al., (2005) encontrou que o consumo de vinho tinto e o vinho tinto sem álcool, aumentaram o acúmulo de compostos fenólicos sem afetar a capacidade antioxidante no plasma sanguíneo.

Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do vinho tinto *Cabernet sauvignon* tem diferentes porcentagens de álcool, do vinho tinto sem álcool e da sinvastatina na alteração dos parâmetros bioquímicos, marcadores bioquímicos do estresse oxidativo e histológicos do tecido aórtico em coelhos hipercolesterolêmicos.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Amostras do vinho tinto**

Foi utilizado o vinho *Cabernet Sauvignon* tinto chileno (2017), com 13 % de álcool, adquirido em Viçosa-MG. Para obter as diferentes dosagens do álcool no vinho tinto, realizou-se a evaporação a vácuo no rotaevaporador (IKA RV 8), a uma temperatura de 40 °C. Por meio da densitometria verificou-se a obtenção das porcentagens de 8 %, 4 % e 0% de álcool.

### **2.2. Determinação de compostos fenólicos**

Segundo a metodologia descrita por (SINGLENTON & ROSSI, 1965), foram determinados os compostos fenólicos presentes no vinho tinto nas diferentes concentrações de álcool (13 %, 8 % e 4 %) e no vinho sem álcool. Mediante a utilização do reagente Folin Ciocalteu, foi lida a absorbância a 760 nm no espectrofotômetro BEL UV-M51 UV-VISÍVEL (BEL Photonics). A análise foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (mg EAG. 100 mL<sup>-1</sup>).

### **2.3. Determinação de antocianinas totais**

As antocianinas totais foram determinadas por meio da metodologia de pH único, descrito por LEES & FRANCIS (1972), utilizando-se etanol: HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup> (85:15) v/v e se realizou a leitura no espectrofotômetro BEL UV-M51 UV-VISÍVEL (BEL Photonics) em comprimento de onda de 535 nm. A análise foi realizada em triplicata, e a quantificação das antocianinas totais foi determinada pela seguinte equação:

$$A = \epsilon l c * b * C \quad (1)$$

Em que:

A - Absorbância em 535 nm

$\epsilon$  l cm - Coeficiente de absorvidade malvidina (29500 Lcm<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>)

C - Concentração (g L<sup>-1</sup>)

b - caminho óptico (1 cm)

Os resultados foram expressos em mg de malvidina por 150 mL de vinho.

### **2.4. Determinação da capacidade antioxidante**

O potencial antioxidante do vinho tinto foi determinado pelo método de estabilização do radical ABTS no comprimento de onda de 734 nm em espectrofotômetro BEL UV-M51 UV-VISÍVEL (BEL Photonics), segundo o descrito por Re et al., (1999). Os resultados foram expressos em  $\mu$ M equivalente de Trolox por 150 mL vinho.

### **2.5. Ensaio biológico**

#### **2.5.1. Animais e dieta**

O trabalho foi realizado segundo as exigências éticas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de laboratório e aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 42/2018 - CEUA/UFV). Foram adquiridos do setor da cunicultura do Departamento de

Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, 30 coelhos machos albinos, de raça Nova Zelândia, entre 100 e 120 dias de vida e peso aproximado de 2,5 Kg. Os coelhos foram acondicionados em gaiolas individuais (45 x 52 x 60 cm), permanecendo em período de adaptação durante uma semana, mantidos em ambiente com controle de temperatura e umidade e com ciclos de luz/escuros por um período de 12 horas, e recebendo diariamente 120 g de ração comercial para coelhos (Presence) e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os coelhos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=5), recebendo diariamente a seguinte dieta:

**Tabela 1.** Tratamento dos animais experimentais.

<b>Grupos</b>	<b>Tratamentos</b>
<b>Grupo controle positivo (G1)</b>	Ração hipercolesterolêmica 0,5 % (120 g) (RH)
<b>Grupo 2 (G2)</b>	RH + 0,3 mg de sinvastatina· Kg· Dia <sup>-1</sup>
<b>Grupo 3 (G3)</b>	RH + 6 mL vinho tinto (13 %)
<b>Grupo 4 (G4)</b>	RH + 6 mL vinho tinto (8 %)
<b>Grupo 5 (G5)</b>	RH + 6 mL vinho tinto (4 %)
<b>Grupo 6 (G6)</b>	RH + 6 mL vinho tinto sem álcool

Fuente. Alviarez, 2019.

A dieta hipercolesterolêmica foi fornecida diariamente por um período de 30 dias e as doses do vinho tinto e a sinvastatina, foram calculadas segundo a doses recomendada para uma pessoa de 70 kg, sendo que a dose recomendada de vinho tinto é de 150 mL (DI CASTELNUOVO et al., 2002) e da sinvastatina é 10 mg. Essas dosagens do vinho tinto e da sinvastatina foram administradas por gavagem oral. A ração hipercolesterolêmica foi produzida pelo enriquecimento de ração comercial padrão (Presence, Brasil) com 0,5 % de colesterol cristalino ( $m \cdot m^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, USA). Para facilitar a gavagem aos animais, uma solução de sinvastatina foi preparada em farmácia de manipulação.

### **2.5.2. Coleta de sangue e tecido**

Realizaram-se três coletas do sangue (3 mL aproximadamente) na veia marginal da orelha nos tempos 0, 15 e 30 dias de experimento, após de 12 horas

de jejum. As amostras foram centrifugadas a 148 RCF por 15 minutos para obtenção do plasma e armazenadas a -80 °C até a realização das análises bioquímicas. Aos trinta dias, realizou-se a eutanásia dos coelhos com o uso de relaxante muscular xilazina (10 mg/kg) e quetamina (50 mg/kg) e com o uso de anestesia geral barbitúrica com tiopental sódico (3 mg/kg), por via intramuscular, sendo então realizada a exsanguinação (punção cardíaca). Os fragmentos de aorta torácica foram coletados e colocados em solução fixadora de paraformaldeído (4 %) para realização das análises histopatológicas e outro fragmento da aorta foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C para realizar as análises antioxidantes.

### **2.5.3. Análises do plasma sanguíneo**

As concentrações plasmáticas de colesterol total (Ct), lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e triglicérides (TG) foram determinadas utilizando kits comerciais (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) em analisador automático (BS 200) (Mindray, Shenzhen, China). A lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi calculada pela equação Friedwald (SPOSITO et al., 2007).

## **2.6. Biomarcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica**

As amostras da aorta congeladas em nitrogênio líquido, foram utilizadas para a preparação dos homogenatos, na proporção de 150 mg de tecido por 1 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol·L<sup>-1</sup>), sendo homogeneizados (MA102/Mini, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) e posteriormente centrifugados a 12000 x g, a 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas análises, que foram realizadas em duplicata. A concentração de proteína total no tecido aórtico foi determinada usando o método de (LOWRY et al., 1951).

### **2.6.1. Ensaio da atividade superóxido dismutase (SOD)**

Foi realizado segundo a metodologia de Madesh e Balasubramanian (1998) com modificações. Foram utilizados 30 µL do homogeneizado das amostras da aorta, 99 µL de tampão fosfato de potássio (0,2 ml·L<sup>-1</sup>, pH7,0), 6 µL de MTT (3-

(4-5 dimethyl thiazol 2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)) ( $1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e 15  $\mu\text{L}$  de pirogalol. Posteriormente essa mistura foi incubada a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos e a reação foi finalizada adicionando-se 150  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido (DMSO). A leitura realizou-se em espectrofotômetro (BEL UV-M51 UV-VISÍVEL (BEL Photonics) no comprimento de onda a 570 nm sendo os resultados expressos em  $\text{U SOD}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ .

### **2.6.2. Atividade da catalase (CAT)**

Foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de homogenato da aorta, com 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em tampão fosfato de potássio ( $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,0). Posteriormente, foi observada em espectrofotômetro a redução da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, durante 60 segundos, sendo os resultados expressos em  $\text{U CAT}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$  (AEBI, 1984).

### **2.6.3. Atividade da glutationa-s-transferase (GST)**

Realizado segundo a metodologia de Habig, Pabst & Jakoby (1974). Para isto, foi preparado o meio de reação com 700  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,0), 10  $\mu\text{L}$  de CDNB (1-cloro-dinitro-benzeno,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de GSH (glutathiona reduzida,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sendo posteriormente adicionado 10  $\mu\text{L}$  do homogenato da aorta. A reação foi observada em comprimento de onda 340 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### **2.6.4. Peroxidacão lipídica pelo ensaio de TBARS (substancias reativas do ácido tiobarbitúrico)**

Segundo a metodologia de Wallin et al. (1993), 0,2 mL da amostra homogeneizada da aorta foi colocado com 0,4 mL da solução de trabalho (TCA, ácido tricloroacético 15 %, TBA, ácido tiobarbitúrico 0,375 % e ácido clorídrico  $0,25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sendo posteriormente aquecida a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 40 minutos. A seguir, as amostras passaram por banho de gelo durante 10 minutos e foram centrifugadas a  $10000 \times g$  por 10 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi lido na absorbância de 532 nm em microplacas de 96 poços. A quantificação do TBARS

se realizou mediante a interpolação da curva padrão com malondialdeído (MDA) e os resultados foram expressos em nmol MDA•mg tecido<sup>-1</sup>.

### **2.6.5. Proteína carbonilada**

O pellet do homogenato da aorta, foi ressuspendido em TCA (10%) em duas etapas de 500 µL cada, utilizando vórtex para agitar. A solução foi dividida em 2 tubos eppendorf (um para amostra e outro para o branco) e centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos a 15°C. Após o descarte do sobrenadante foi adicionado 500 µL DNPH (0,01 nmol) para a amostra e 500 µL HCl (2 mol L<sup>-1</sup>) para o branco. Posteriormente, foram agitados no vórtex e incubados no escuro a temperatura ambiente, agitando novamente aos 15 minutos e aos 30 minutos. Após os 30 minutos, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a 15 °C e o sobrenadante descartado. Foram realizadas 3 lavagens consecutivas, com 1 mL de acetato de etila e etanol (1:1), agitando em vórtex, centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos a 15 °C, descartando o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 1 mL SDS (6 %) a cada tubo de eppendorf, centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos a 15 °C. Foram pipetados 200 µL do sobrenadante na placa da amostra e do branco da amostra e a leitura feita a 370 nm (LEVINE et al., 1990).

## **2.7. Avaliação histológica da aorta**

### **2.7.1. Inclusão em resina**

Os fragmentos de aorta foram fixados em solução de paraformaldeído (4 %) durante 24 horas e posteriormente transferidos para álcool 70 %. Para a inclusão em resina, os fragmentos aórticos foram desidratados em soluções crescentes de etanol (80 %, 90 %, 95 % e 100 %), com trocas cada 30 minutos, realizando-se a inclusão em glicolmetacrilato (Historesin®, Leica). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com intervalo de 15 µm, com 3 µm de espessura utilizando o micrótomo rotativo (Leica) e navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1 % (m/v) e montadas com Entellan® sendo as imagens obtidas pelo uso do microscópio estereoscópio (Olympus, BX-53, Tóquio, Japão), numa objetiva de 1X e aumento de 2.5.

### **2.7.2. Morfometria da aorta**

O estudo morfométrico foi conduzido para medir, nos cortes histológicos das aortas, as áreas das placas de ateroma formadas no vaso, foram determinadas mediante a contagem de pontos sobre a placa de ateroma. As análises foram realizadas com auxílio do programa de análises de imagens Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetcs, Rockville, EUA).

### **2.8. Análise estatística**

Para a atividade antioxidante, cada replicata foi analisada individualmente e os dados foram registrados como a média de três determinações (n=3X3) DP (n=3X3) pelo teste de Tukey foram comparadas as médias entre as diferentes concentrações dos vinhos tinto utilizados ( $p \leq 0,05$ ).

No ensaio animal, após dos testes de normalidade foi realizado a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação das médias entre os grupos experimentais. Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). O nível de significância considerado foi de  $p \leq 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Compostos fenólicos**

Na tabela 2, são mostrados os valores da determinação de compostos fenólicos, antocianinas e potencial antioxidante pelo método de ABTS. A dosagem de vinho tinto 4 % foi significativamente menor no valor do total dos compostos fenólicos entre as demais dosagens de álcool; enquanto o vinho tinto sem álcool foi superior no valor das antocianinas totais. Não foi encontrado diferença significativa da capacidade antioxidante pelo ABTS.

**Tabela 2.** Teor de compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante no vinho tinto nas diferentes dosagens de álcool 13 %, 8 %, 4 % e sem álcool.

	<b>Fenólicos Totais (Mg EAG · 150 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Antocianinas Totais (Mg Malvidina · 150 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Potencial Antioxidante pelo ABTS (μM ET · 150 mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>Vinho tinto 13 %</b>	370,84±9,45 <sup>a</sup>	59,34±1,12 <sup>a</sup>	1916,24±5,31 <sup>a</sup>
<b>Vinho tinto 8 %</b>	369,55±23,74 <sup>a</sup>	65,56±3,92 <sup>b</sup>	2045,25±0,22 <sup>a</sup>
<b>Vinho tinto 4 %</b>	356,40±14,30 <sup>b</sup>	69,13±3,80 <sup>bc</sup>	2589±7,47 <sup>a</sup>
<b>Vinho sem álcool</b>	406,29±10,82 <sup>a</sup>	73,62±0,1 <sup>c</sup>	2478±1,92 <sup>a</sup>

Dados são expressos como a média± desvio padrão (n=3). Medias na mesma coluna com letras diferentes difere significativamente pelo teste SNK ( $p \leq 0.05$ ). EAG. Equivalente de ácido gálico. μM ET. Micromol equivalente de trolox.

Fonte. Alvarez, 2019.

### 3.2. Plasma sanguíneo

Ao começar o experimento todos os grupos apresentaram valores similares de CT, HDL-C, LDL-c e TG (tabela 1). Após iniciado o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica, a concentração plasmática dos parâmetros avaliados aumentou com exceção do HDL-c. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle.

Com a avaliação desses parâmetros ao longo do tempo, foi evidenciado que o CT, LDL-c e TG aumentaram em todos os grupos após 15 dias de experimento. O valor do HDL-c foi constante durante todo o experimento nos grupos avaliados a exceção do grupo G2 que apresentou diminuição ao final do experimento comparado com o valor inicial.

**Tabela 1.** Concentrações plasmáticas de Colesterol total, colesterol LDL-C, colesterol HDL-C e triglicérides.

<i>Parâmetros</i>	<i>Tempo (dias)</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>
<i>Colesterol total</i>	<i>0</i>	68,60±19,20 <sup>aA</sup>	60,60±11,89 <sup>aA</sup>	63,00±4,64 <sup>aA</sup>	58,80±17,41 <sup>aA</sup>	65,00±17,82 <sup>aA</sup>	66,60±13,37 <sup>aA</sup>
	<i>15</i>	885,60±292,49 <sup>aB</sup>	1075,20±210,90 <sup>aB</sup>	950,80±89,02 <sup>aB</sup>	946,0±328,54 <sup>aB</sup>	951,20±162,39 <sup>aB</sup>	1128,00±484,62 <sup>aB</sup>
	<i>30</i>	1114,00±285,98 <sup>aB</sup>	1106,80±270,70 <sup>aB</sup>	1060,40±165,06 <sup>aB</sup>	891,20±641,4 <sup>aB</sup>	1100,00±181,60 <sup>aB</sup>	1075,60±191,73 <sup>aB</sup>
<i>HDL</i>	<i>0</i>	34,00±10,88 <sup>aA</sup>	32,80±5,76 <sup>aA</sup>	29,20±5,26 <sup>aA</sup>	27,60±7,02 <sup>aA</sup>	34,40±6,66 <sup>aA</sup>	30,00±6,74 <sup>aA</sup>
	<i>15</i>	24,80±9,96 <sup>aA</sup>	19,20±5,46 <sup>aB</sup>	14,40±13,74 <sup>aA</sup>	19,20±9,44 <sup>aA</sup>	24,40±9,21 <sup>aA</sup>	26,80±8,56 <sup>aA</sup>
	<i>30</i>	28,40±13,96 <sup>aA</sup>	16,47±11,41 <sup>aB</sup>	18,33±13,67 <sup>aA</sup>	22,00±10,20 <sup>aA</sup>	24,40±8,53 <sup>aA</sup>	22,00±2,00 <sup>aA</sup>
<i>LDL</i>	<i>0</i>	24,80±18,03 <sup>aA</sup>	19,04±9,59 <sup>aA</sup>	24,96±6,95 <sup>aA</sup>	18,12±9,85 <sup>aA</sup>	22,20±13,69 <sup>aA</sup>	26,08±11,92 <sup>aA</sup>
	<i>15</i>	795,60±253,26 <sup>aB</sup>	945,12±154,21 <sup>aB</sup>	868,40±67,88 <sup>aB</sup>	856,16±301,16 <sup>aB</sup>	848,08±147,03 <sup>aB</sup>	1003,92±393,00 <sup>aB</sup>
	<i>30</i>	1008,40±257,09 <sup>aB</sup>	988,16±233,50 <sup>aB</sup>	957,05±163,10 <sup>aB</sup>	786,48±556,91 <sup>aB</sup>	964,32±138,36 <sup>aB</sup>	985,60±207,50 <sup>aB</sup>
<i>Triglicérides</i>	<i>0</i>	49,00±14,39 <sup>aA</sup>	43,80±22,13 <sup>aA</sup>	44,20±11,37 <sup>aA</sup>	65,40±26,88 <sup>aA</sup>	42,00±12,10 <sup>aA</sup>	52,60±22,05 <sup>aA</sup>
	<i>15</i>	328,00±216,20 <sup>aB</sup>	554,40±375,71 <sup>aB</sup>	340,00±134,10 <sup>aB</sup>	353,20±185,05 <sup>aA</sup>	393,60±193,50 <sup>aB</sup>	486,40±4633,31 <sup>aB</sup>
	<i>30</i>	386,00±237,20 <sup>aB</sup>	510,80±290,30 <sup>aB</sup>	448,40±120,10 <sup>aB</sup>	413,60±433,08 <sup>aA</sup>	556,40±290,10 <sup>aB</sup>	340,00±148,47 <sup>aB</sup>

G1. Ração hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg<sup>-1</sup>· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Medias com letras minúsculas diferentes na linha difere significativamente e letras maiúsculas diferentes na coluna mostra diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste SNK (p≤0,05).

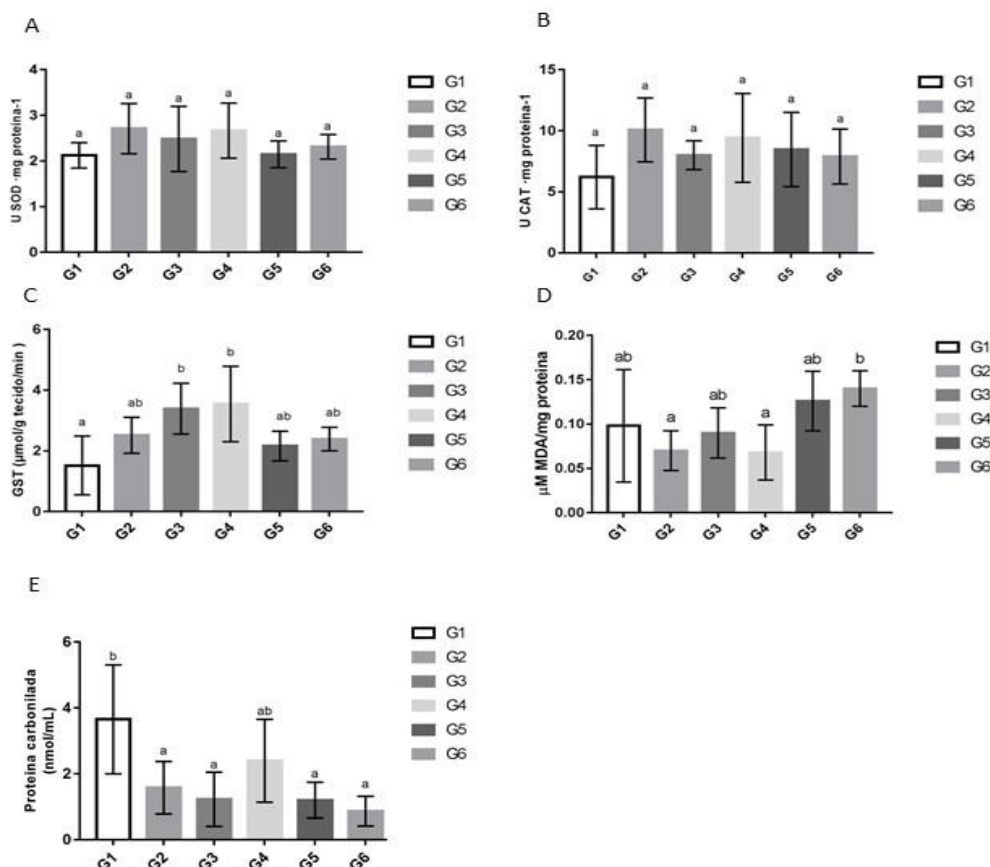
Fuente. Alvarez, 2019.

### 3.3. Biomarcadores de estresse oxidativo e peroxidação

A ração hipercolesterolêmica durante 30 dias nos coelhos avaliados não alterou as atividades dos sistemas antioxidantes endógenas SOD e CAT (figura 1A e 1B), porém a atividade da enzima GST aumentou nos grupos que foram fornecidos com o vinho tinto 8 e 13 % em relação ao controle (figura 1C).

A concentração de MDA aumentou nos animais que receberam o vinho tinto sem álcool (G6) em relação aos animais que receberam a sinvastatina (G2) e o vinho tinto (8 %) (G4) (figura 1D). A produção de proteína carbonilada foi reduzida nos grupos que receberam vinho tinto com 13 % e 4 %, o vinho tinto sem álcool e a sinvastatina comparado com o grupo controle (figura 1E).

**Figura 1.** Biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica em coelhos alimentados com ração hipercolesterolêmica.

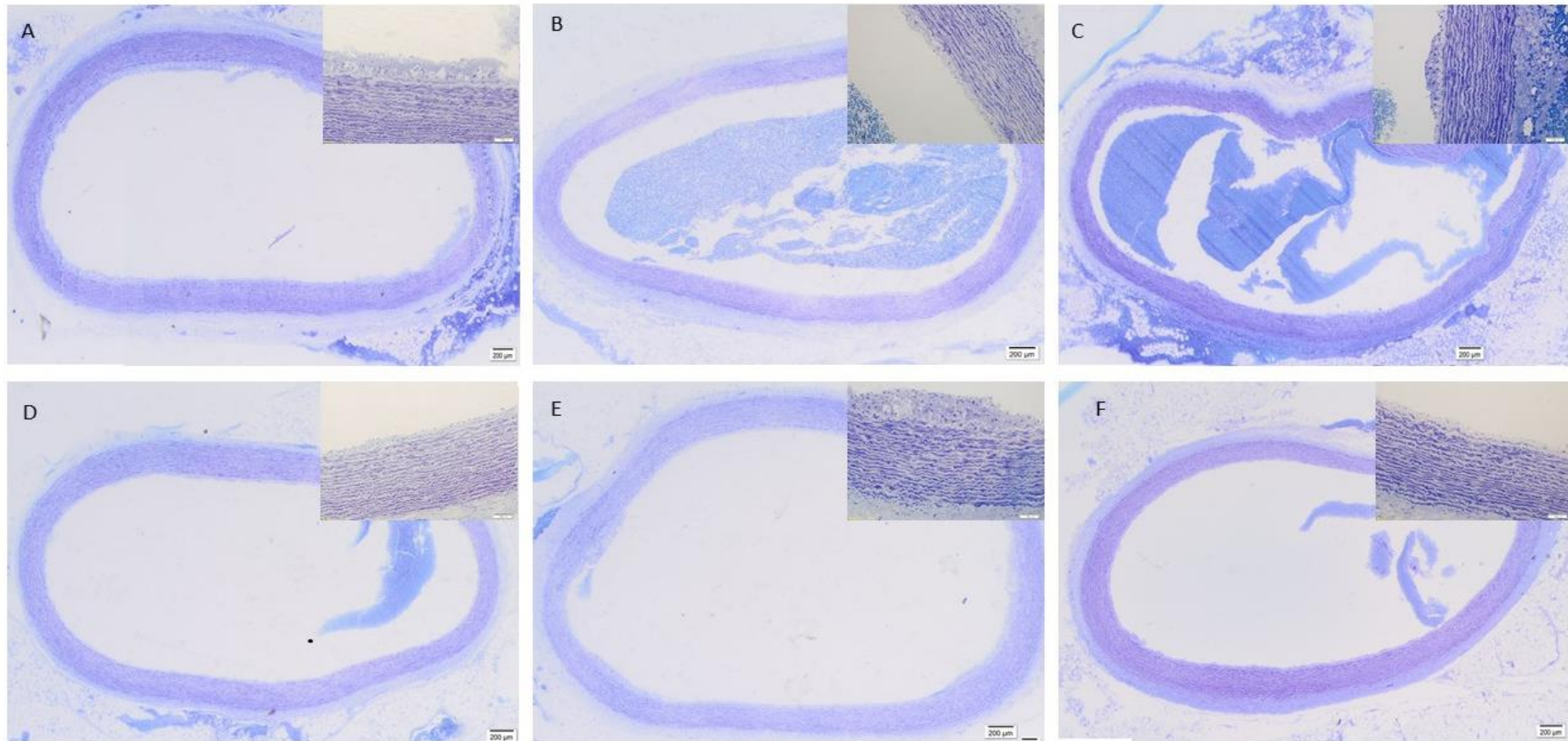


G1. Ração hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Letras diferentes na linha difere significativamente pelo teste SNK (p<0,05).  
Fonte. Alvarez, 2019.

### **3.4. Avaliação histológica da aorta**

As microfotografias dos cortes histológicos da aorta evidenciaram-se a formação da placa ateromatosa nos animais alimentados com a dieta hipercolesterolêmica (figura 2). O grupo G1 apresentou formação da placa ateromatosa em toda a cavidade aórtica (figura 2A); foi observado que o consumo do vinho tinto com e sem álcool foram eficientes quanto à sinvastatina na capacidade de reduzir a progressão da formação da placa de ateroma (figuras 2B-2F).

**Figura 2.** Fotomicrografias dos cortes histológicos do tecido aórtico de coelhos alimentados com ração hipercolesterolêmica, sinvastatina, vinho tinto 13 %, 8 %, 4 % de álcool e vinho tinto evaporado.

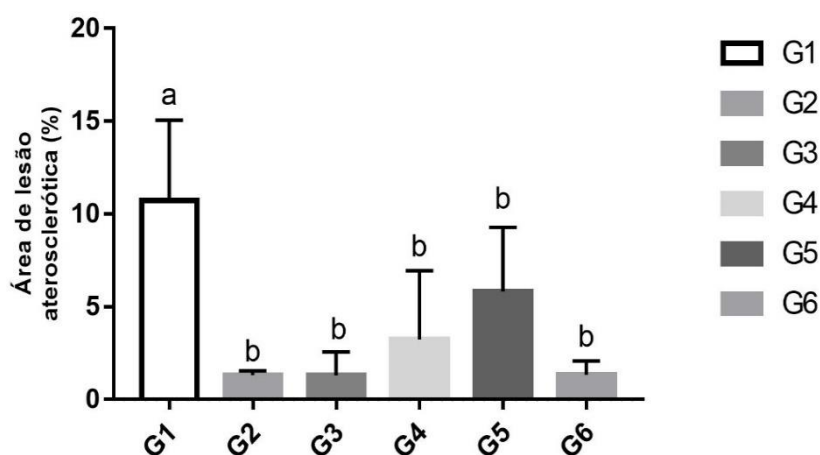


Coloração azul de toluidina-borato de sódio. A= G1. Ração hipercolesterolêmica; B= G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; C= G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; D= G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; E= G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; F= G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias.

Fonte. Alviarez, 2019.

Foi evidenciado que o consumo durante 30 dias de vinho tinto com e sem álcool evitaram a progressão da placa de ateroma nos coelhos hipercolesterolêmicos o que pode ser evidenciado na Figura 3. A área da lesão aterosclerótica foi significativamente menor nos grupos G2, G3, G4, G5 e G6 que a observada no G1, obtendo redução de respectivamente de 86, 86, 66, 39 e 86 % (Figura 3).

**Figura 3.** Área de lesão aterosclerótica em coelhos alimentados com ração hipercolesterolêmica. G1. Ração hipercolesterolêmica



G1. Ração hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Letras diferentes na coluna difere significativamente pelo teste SNK (p≤0,05).

Fonte. Alvarez, 2019.

#### 4. DISCUSSÃO

A avaliação dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do vinho tinto com e sem álcool, permitiu verificar que o vinho tinto 4 % apresentou menor teor de fenólicos totais e não houve diferença significativa da capacidade antioxidante nas diferentes dosagens do álcool no vinho tinto. Os valores encontrados para compostos fenólicos e antocianinas totais foram semelhantes aos obtidos por Di Majo et al., 2008, Granato et al., (2010) e Mihailovic-Stanojevic et al. (2016). Os principais compostos fenólicos presentes no vinho tinto são os flavonoides que inclui as antocianinas, os flavonols e os flavan-3-ols e os não flavonoides que inclui os ácidos hidroxicinâmicos, ácidos benzoicos, taninos

hidrolisável e estilbenos (resveratrol) (HASEEB; ALEXANDER; BARANCHUK, 2017; MIHAJLOVIC-STANOJEVIC et al., 2016). É conhecido que o teor dos compostos fenólicos do vinho tinto é variável, pois depende desde a escolha do tipo de uva, as condições ambientais, do processo de elaboração do vinho, que é o que determina a extração dos compostos fenólicos (CHEYNIER, 2006).

Vários estudos tem reportado que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos traz benefícios na saúde, tem verificado que o suco pode inibir a agregação plaquetária, reduzir o colesterol no plasma sanguíneo e reduz o desenvolvimento da placa de ateroma (SHANMUGANAYAGAM et al. 2007).

Após da determinação dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do vinho tinto com e sem álcool, se deu início ao fornecimento da dieta hipercolesterolêmica e as diferentes dosagens do vinho tinto com e sem álcool aos coelhos durante 30 dias.

Após o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica, foi observado que aumentaram os parâmetros sanguíneos de Ct, LDL-c, e TAG em todos os grupos avaliados após de 15 dias de experimento, sendo que os níveis plasmáticos de Ct aumentaram até 18 vezes aos 30 dias de experimento. Não se encontraram alterações destes parâmetros pelo consumo do vinho tinto com e sem álcool. Estudos anteriores têm relatado que em coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, o teor de colesterol no plasma sanguíneo aumenta até 37 vezes no primeiro mês e 43 vezes depois de quatro meses, sendo encontrado principalmente o LDL-c (MAHFOUZ; KUMMEROW, 2000) sendo considerado o coelho o melhor modelo animal experimental para avaliar a aterosclerose.

Os resultados obtidos são similares ao trabalho de Wang et al. (2002) avaliaram o efeito do resveratrol, vinho tinto com e sem álcool em coelhos hipercolesterolêmicos e não encontraram diferença significativa entre os animais tratados e o grupo que foi alimentado com colesterol. De igual maneira, Wang et al. (2005), que avaliaram o efeito do vinho tinto com e sem álcool em coelhos hipercolesterolêmicos e encontraram que os níveis de colesterol plasmático não tiveram variação, mas os animais que receberam o vinho tinto com e sem álcool apresentaram valores menores de colesterol total e LDL-c no plasma sanguíneo quando comparados com o grupo hipercolesterolêmico. Embora, no trabalho de Mihajlovic-stanojevic et al., (2016), avaliaram o consumo do vinho tinto com e

sem álcool em ratos hipertensos e, observaram que no vinho tinto com álcool aumentou a concentração de colesterol total, triglicérides e, no vinho tinto sem álcool esses parâmetros não foram afetados.

No presente trabalho o LDL-c aumentou até quase 50 vezes em todos os grupos aos 30 dias após o início do fornecimento de colesterol, comparado com os valores iniciais, sem encontrar diferenças entre os grupos ao final do experimento. O aumento dos valores do LDL é a consequência da alimentação com dieta hipercolesterolêmica, em que os animais são muito susceptíveis ao aumento de colesterol e peroxidação lipídica no fígado e plasma sanguíneo. Os produtos formados são os oxisteróis, compostos de 27 carbonos, conhecidos por serem agentes pró oxidantes e pró inflamatórios, e acredita-se que são causadores de doenças como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, esteatose alcoólica e não alcoólica, esteato-hepatite e inflamação intestinal (MAHFOUZ & KUMMEROW, 2000; POLI; BIASI; LEONARDUZZI, 2013; WIELKOSZYŃSKI et al., 2018).

Ressalta-se que os animais do grupo G4 apresentaram valores baixos para os níveis de LDL-c e Ct, o que indicaria que uma porcentagem moderada de álcool, junto com os compostos fenólicos do vinho tinto, apresenta efeito ateroprotetor.

Os grupos tratados com vinho tinto com e sem álcool não mostraram diferenças significativas durante todo o experimento, provavelmente pela dieta hipercolesterolêmica e o consumo do álcool, que fez com que não se observasse o aumento significativo do HDL-c quando comparado ao controle, da mesma maneira, Da Luz et al., (1999), reportou que os níveis de HDL-c não foi afetado, em coelhos alimentados com dieta colesterolêmica e fornecimento de vinho tinto e também resultados similares aos registrados por Mihailovic-Stanojevic et al., (2016) e foi evidenciado também que o consumo de vinho tinto em pessoas saudáveis e pessoas com sobrepeso, não houve alteração do HDL-c no plasma sanguíneo ao final de 30 dias de experimento (KARADENIZ et al., 2014).

Os níveis de TAG aumentaram após início do fornecimento da dieta hipercolesterolêmica, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados e o controle. Destaca-se que o grupo que recebeu sinvastatina percentualmente, apresentou maior nível de TAG de 69 % aos 15 dias e 32,33 % aos 30 dias; o grupo ao qual foi fornecido com vinho tinto 4 %

apresentou -44,14 % e o vinho tinto sem álcool - 11,92 % do nível de TAG em comparação ao grupo controle.

O consumo do vinho tinto exibiu valores menores de Ct, TAG e, LDL em relação ao grupo que recebeu a sinvastatina, podendo o vinho tinto ser considerado uma boa alternativa para controlar o aumento dos lipídios no plasma sanguíneo. Sabe-se que o uso de sinvastatina leva ao desenvolvimento de hepatotoxicidade, danos cardiovasculares aumento de doenças musculares, rabdomiólise e até se tem relacionado com o desenvolvimento de doenças neurocognitivas (BJÖRNSSON; JACOBSEN; KALAITZAKIS, 2012; SAIB et al., 2013; THOMPSON et al., 2016).

Diversos estudos tem reportado que uma dieta hipercolesterolêmica e a oxidação do etanol no organismo, induz o estresse oxidativo, pelo aumento de EROS levando à depleção das enzimas antioxidantes, contribuindo ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (MAHFOUZ; KUMMEROW, 2000; GARJANI et al., 2009; KONG et al., 2013; BARBOZA et al., 2016; CHASSOT et al., 2018). Del Boccio et al., (1990) determinaram que a atividade das enzimas CAT, GST e Glutathione redutase diminuem em tanto, que a SOD e glutathione peroxidase aumenta no tecido aórtico de coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, resultados similares foram reportados por Mantha et al. (1993) no aumento da SOD no tecido aórtico de coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica e coelhos que além do colesterol foram fornecidos com vitamina E.

O consumo do vinho tinto com e sem álcool não alterou a atividade das enzimas SOD e CAT no tecido aórtico dos coelhos hipercolesterolêmicos, mas a atividade da enzima GST aumentou nos animais que receberam as maiores dosagens de álcool no vinho tinto (G3 e G4). A GST, é uma enzima de segunda ordem, encarregada da detoxificação celular, principalmente dos lipoperóxidos, gerados durante o dano celular. Para isto, a glutathione se conjuga com os compostos xenobióticos, formando produtos mais solúveis que sejam de fácil eliminação (SHARMA et al., 2004; SHEEHAN et al., 2001). A elevação da atividade da GST nos grupos com maiores dosagens de álcool, provavelmente foi causada pelo aumento das EROS, gerado pela oxidação do etanol. Isso fez com que aumentasse a atividade da GST para reduzir a peroxidação lipídica no tecido aórtico, evitando desse modo acúmulo de lipídios na túnica íntima, o que estaria relacionado com a

redução do MDA. Além disso, o aumento do MDA nos animais que receberam o vinho tinto sem álcool pode estar relacionado com a redução da atividade da GST.

As proteínas carboniladas são formadas no processo de oxidação, sendo utilizado como biomarcador de estresse (DIAZ-ACOSTA & MEMBRILLO-HERNANDEZ, 2006). Foi evidenciado que o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica, gerou aumento do estresse oxidativo, levando a ter uma maior produção de proteína carbonilada quando comparado com os grupos avaliados. Esses resultados mostram que o estresse oxidativo gerado pela dieta hipercolesterolêmica, levou à oxidação das proteínas, e tanto o vinho tinto com e sem álcool, ajudaram na proteção contra a peroxidação lipídica e oxidação das proteínas no tecido aórtico dos coelhos hipercolesterolêmicos.

Os resultados mostraram que a dieta hipercolesterolêmica provocou o desenvolvimento da placa aterosclerótica, sendo significativamente maior no grupo G1. Esses resultados foram similares a estudos anteriores, que mostraram que o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica, contribuiu no desenvolvimento das placas de ateroma, como o reportado por Chassot et al., (2018) em ratos e Mosimann et al., (2006), Choi et al., (2010) e Barboza et al., (2016) em coelhos suplementados com dieta rica em gordura. Foi evidenciado que os grupos que receberam o vinho tinto com e sem álcool apresentaram a progressão da placa de ateroma atenuada. Logo, os compostos fenólicos do vinho tinto com ou sem álcool, ajudam na diminuição da progressão da placa de ateroma.

Os resultados concordam com pesquisas realizadas anteriormente, que afirmam que o consumo moderado de vinho tinto ajuda na redução do desenvolvimento da aterosclerose, como o realizado pelo Auger et al., (2002) sugeriram que o álcool junto com os fenólicos do vinho tinto confere os benefícios na saúde, mas que o vinho tinto sem álcool seria uma melhor alternativa. Outros estudos tem reportado que a capacidade de reduzir a placa de ateroma é realizada só pela ação dos compostos fenólicos do vinho tinto (WANG et al., 2005). Por outro lado, Chassot et al., (2018) registraram que o consumo de vinho tinto com e sem álcool não teve efeito na atenuação da placa de ateroma, confirmando que o efeito é causado pelo sinergismo entre o vinho e a dieta mediterrânea. Um estudo realizado com suco de uva Concord, também apresentou diminuição da agregação plaquetária e no

desenvolvimento da placa de ateroma em coelhos hipercolesterolêmicos (SHANMUGANAYAGAM et al., 2007). Da Luz et al., (1999) também reportaram que o consumo de vinho tinto com e sem álcool, protegeram o desenvolvimento da placa de ateroma.

O efeito protetor do vinho tinto na redução da formação da placa de ateroma, pode ser o resultado da atividade das enzimas antioxidantes, principalmente da GST, prevenindo o estresse oxidativo no tecido aórtico e provavelmente diminuindo a oxidação do LDL. Por conseguinte, esses resultados foram confirmados nas análises dos cortes histológicos do tecido aórtico. O NF- $\kappa$ B, quando é ativado pelo LDL oxidado, leva ao aumento das moléculas de adesão (ICAM, VCAM), sendo responsável pela formação da placa de ateroma, entretanto o consumo do vinho tinto inativa esse NF- $\kappa$ B diminuindo o risco de desenvolvimento da aterosclerose (BLANCO-COLIO et al., 2000; ZERN & FERNANDEZ, 2005). Karadeniz et al., (2014) sugeriram que o consumo moderado de vinho tinto influencia no aumento da atividade da paraoxonase e arilesterase levando à redução de LDL oxidado.

Foi demonstrado que o consumo do vinho tinto com 8 e 13 % de álcool incrementaram a atividade da enzima antioxidante GST, em tanto que, o vinho tinto com e sem álcool atenuaram o estresse oxidativo no tecido aórtico de coelhos hipercolesterolêmicos. Por tanto os resultados obtidos podem afirmar que o consumo moderado (150 mL) do vinho tinto com e sem álcool ajudam na atenuação da placa de ateroma, sendo tão eficientes como a sinvastatina.

## **5. CONCLUSÕES**

Os vinhos tintos, com e sem álcool reduziram a peroxidação lipídica de forma tão eficiente quanto a sinvastatina. Embora não tenha influenciado os parâmetros sanguíneos de CT, LDL, HDL, os vinhos tintos 13 % e 8 % modificaram a atividade antioxidante da GST, favorecendo a proteção do tecido aórtico dos danos provocados pela dieta hipercolesterolêmica. Foi evidenciado nos cortes histológicos da aorta que o consumo moderado do vinho tinto com e sem álcool

foi tão eficiente quanto a sinvastatina na atenuação da lesão aterosclerótica em coelhos hipercolesterolêmicos avaliados nesse estudo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126, 1984.

ARENDDT, B. M. et al. Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: A randomized controlled trial (ISRCTN68505294). *Nutrition Journal*, 4, 1–11, 2005.

AUGER, C.; CAPORICCIO, B.; LANDRAULT, N.; TEISSEDE, P.L.; LAURENT, C.; CROS, G.; BESANÇON, P. & ROUANET, J.M. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *The journal of nutrition*, 132(6), 1207-1213, 2002.

BARBOZA, L.N.; DOS REIS LÍVERO, F.A.; PRANDO, T.B.L.; RIBEIRO, R.D.C.L.; LOURENÇO, E.L.B.; BUDEL, J.M.; DE SOUZA, L.M.; ACCO, A.; DALSENTER, P.R. & JUNIOR, A.G. Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) JF Macbr. in New Zealand rabbits fed with cholesterol-rich diet. *Journal of ethnopharmacology*, 187, 134-145, 2016.

BJÖRNSSON, E.; JACOBSEN, E. I.; KALAITZAKIS, E. Hepatotoxicity associated with statins: Reports of idiosyncratic liver injury post-marketing. *Journal of Hepatology*, 56(2), 374–380, 2012.

BLANCO-COLIO, L.M.; VALDERRAMA, M.; ALVAREZ-SALA, L.A.; BUSTOS, C.; ORTEGO, M.; HERNÁNDEZ-PRESA, M.A.; CANCELAS, P.; GÓMEZ-GERIQUE, J.; MILLÁN, J. & EGIDO, J., 2000. Red wine intake prevents nuclear factor- $\kappa$ B activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation*, 102(9), 1020-1026, 2000.

CHASSOT, L. N.; SCOLARO, B.; ROSCHEL, G. G.; COGLIATI, B.; CAVALCANTI, M. F.; ABDALLA, D. S. & CASTRO, I. A. Comparison between red wine and isolated trans-resveratrol on the prevention and regression of atherosclerosis in LDLr (-/-) mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 61, 48-55, 2018.

CHEYNIER V. Flavonoides in wine. In: Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. 6. ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/ Taylor & Francis Group, 2006. p. 263–289.

CHOI, U.K.; LEE, O.H.; YIM, J.H.; CHO, C.W.; RHEE, Y.K.; LIM, S.I. & KIM, Y.C. Hypolipidemic and antioxidant effects of dandelion (*taraxacum officinale*) root and leaf on cholesterol-fed rabbits. *International journal of molecular sciences*, 11(1), 67-78, 2010.

- DA LUZ, P. L.; Serrano Jr, C.V.; Chacra, A.P.; Monteiro, H.P.; Yoshida, V.M.; Furtado, M.; Ferreira, S.; Gutierrez, P. & Pileggi, F. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid independent protection. *Experimental and Molecular Pathology*, 65(3), 150–159, jan. 1999.
- DEL BOCCIO, G.; LAPENNA, D.; PORRECA, E.; PENNELLI, A.; SAVINI, F.; FELICIANI, P.; RICCI, G. & CUCCURULLO, F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 81(2), 127-135, 1990.
- DI MAJO, D.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; LA NEVE, L.; GIAMMANCO, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*. 111 (1), 45–49, 2008.
- DÍAZ-ACOSTA, A. E., & MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, J. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. TIP. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 9(1), 34-44, 2006.
- DI CASTELNUOVO, A.; ROTONDO, S.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M. B.; & DE GAETANO, G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*, 105(24), 2836–2844, 2002.
- GARJANI, A.; FATHIAZAD, F.; ZAKHERI, A.; AKBARI, N.A.; AZARMIE, Y.; FAKHRJOO, A.; ANDALIB, S. & MALEKI-DIZAJI, N. The effect of total extract of *Securigera securidaca* L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 126(3), 525-532, 2009.
- GRANATO, D., KATAYAMA, F. C. U., & CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*, 43(10), 1542-1549, 2010.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139, 1974.
- HASEEB, S.; ALEXANDER, B.; BARANCHUK, A. Wine and Cardiovascular Health. *Circulation*, 136(15), 1434–1448, 2017.
- KARADENIZ, M.; AKÇAY, Y. D.; YILDIRIM, H. K.; YILMAZ, C. & SÖZMEN, E. Y. Effect of red wine consumption on serum oxidation and adiponectin levels in overweight and healthy individuals. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(3), 201–207, 2014.
- KONG, L.; LUO, C.; LI, X.; ZHOU, Y. & HE, H. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), 115, 2013.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. G. Standardization of pigment analysis in cranberries. *Hortscience*, 7, 83–84, 1972.
- LEIVA, E., WEHINGER, S., GUZMÁN, L., & ORREGO, R. Capítulo 3. Role of Oxidized LDL. In Atherosclerosis. **Hypercholesterolemia**. InTech, 2015.

- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S. & STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–478, 1990.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–75, nov. 1951.
- MADESH, M. & BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 35(3), 84–188, 1998.
- MAHFOUZ, M. M. & KUMMEROW, F. A. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(5), 293–302, 2000.
- MANTHA, S.V.; PRASAD, M.; KALRA, J. & PRASAD, K.; 1993. Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis*, 101(2), 135-144, 1993.
- MIHAILOVIC-STANOJEVIC, N.; SAVIKIN, K.; ZIVKOVIC, J.; ZDUNIC, G.; MILORADOVIC, Z.; IVANOV, M.; KARANOVIC, D.; VAJIC, U.J.; JOVOVIC, D. & GRUJIC-MILANOVIC, J. Moderate consumption of alcohol-free red wine provide more beneficial effects on systemic haemodynamics, lipid profile and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats than red wine. *Journal of Functional Foods*, 26, 719–730, 2016.
- MOSIMANN, A.L.P.; WILHELM-FILHO, D. & DA SILVA, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*, 26(1), 59-70, 2006.
- NOGUER, M. A.; CEREZO, A. B.; NAVARRO, E. D. & GARCIA-PARRILLA, M. C. Intake of alcohol-free red wine modulates antioxidant enzyme activities in a human intervention study. *Pharmacological Research*, 65(6), 609–614, 2012.
- POLI, G.; BIASI, F. & LEONARDUZZI, G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biology*, 1(1), 125–130, 2013.
- Re, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237, 1999.
- RENAUD, S. D. & DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526, 1992.
- SAIB, A.; SABBAAH, L.; PERDRIX, L.; BLANCHARD, D.; DANCHIN, N.; & PUYMIRAT, E. Evaluation of the impact of the recent controversy over statins in France: the EVANS study. *Archives of cardiovascular diseases*, 106(10), 511-516, 2013.

- SCHRIEKS, I. C.; VAN DEN BERG, R.; SIERKSMA, A.; BEULENS, J.W.; VAES, W.H. & HENDRIKS, H. Effect of red wine consumption on biomarkers of oxidative stress. *Alcohol and Alcoholism*, 48(2), 153–159, 2013.
- SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Alcohol-Free Red Wine Enhances Plasma Antioxidant Capacity in Humans. *The Journal of Nutrition*, 128(6), 1003–1007, 1998.
- SHANMUGANAYAGAM, D.; WARNER, T.F.; KRUEGER, C.G.; REED, J.D. & FOLTS, J.D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 190(1), 135–42, jan. 2007.
- SHARMA, R.; YANG, Y.; SHARMA, A.; AWASTHI, S. & AWASTHI, Y.C., 2004. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(2), 289-300, 2004.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M. & DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal*, 360(1), 1-16, 2001.
- SINGLENTON, V, L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *The American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158, 1965.
- SPOSITO, A. C. et al. IV diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose departamento de aterosclerose da sociedade Brasileira de Cardiologia Coordenação Geral Coordenador de normatizações e diretrizes membros do Comitê Arquivos Brasileiros de Cardiologia. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v88s1/01.pdf>>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- THOMPSON, P. D.; PANZA, G., ZALESKI, A. & TAYLOR, B. Statin-associated side effects. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(20), 2395–2410, 2016.
- VILAHUR, G.; BADIMON, L. Antiplatelet properties of natural products. *Vascular Pharmacology*. 59(3-4), 67–75, set. 2013.
- WALLIN, B.; ROSENGREN, B., SHERTZER, H. G., & CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*, 208(1), 10-15, 1993.
- WANG, Z., HUANG, Y., ZOU, J., CAO, K.; XU, Y., WU, J. M. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 9(1), 77–79, 2002.
- WANG, Z. et al. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *International journal of molecular medicine*. 16(4), 533–540, 2005.

WARD, N. C.; WATTS, G. F.; ECKEL, R. H. Statin Toxicity. *Circulation Research*, 124(2), 328–350, 2019.

WIELKOSZYŃSKI, T.; ZALEJSKA-FIOLKA, J.; STRZELCZYK, J. K.; OWCZAREK, A. J.; CHOLEWKA, A.; FURMAŃSKI, M. & STANEK, A. Oxysterols increase inflammation, lipid marker levels and reflect accelerated endothelial dysfunction in experimental animals. *Mediators of Inflammation*, 2018, 2018.

WHO. **Cardiovascular Diseases**. Disponível em: <[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 11 ago. 2019.

ZERN, T. L. & FERNANDEZ, M. L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *The Journal of nutrition*, 135(10), 2291–4, 2005.



**ARTIGO II. CONSUMO DIARIO DO VINHO TINTO *Cabernet Sauvignon*  
PROMOVE PROTEÇÃO HEPÁTICA EM COELHOS  
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

## Resumo

O aumento do consumo e bebidas alcoólicas, principalmente do vinho tinto, está relacionado ao seu alto teor de compostos bioativos, e sua capacidade protetora contra doenças relacionadas com o aumento do estresse oxidativo no organismo. No entanto, ainda há dúvida se seu efeito é devido ao álcool ou aos compostos fenólicos presentes. Por conseguinte, o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade hepatoprotetora do vinho tinto em diferentes dosagens de álcool (13 %, 8 % e 4 %) e vinho tinto sem álcool em coelhos hipercolesterolêmicos durante 30 dias. Neste ensaio, 30 coelhos foram divididos em seis grupos: ração hipercolesterolêmica; ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg de sinvastatina· kg<sup>-1</sup>· dia<sup>-1</sup>; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool. Foram determinados a concentração plasmática dos marcadores hepáticos AST, ALT,  $\gamma$ GT, lipase e fosfatase alcalina (ALP), marcadores renais, biomarcadores de estresse oxidativo e as análises histomorfométricas do tecido hepático. Os resultados mostraram que o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica e o vinho tinto, aumentaram os níveis plasmáticos de  $\gamma$ GT e não afetou os níveis dos marcadores renais. A atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático, aumentaram no vinho tinto 13 % para SOD e no vinho tinto sem álcool para SOD e CAT. Nas análises histológicas foi evidenciado que o vinho tinto com e sem álcool reduziram o acúmulo de lipídios no tecido hepático. Esses resultados indicam que o consumo diário de vinho tinto ajuda na proteção hepática de coelhos hipercolesterolêmicos.

**Palavras-chave:** Vinho tinto; vinho tinto sem álcool; colesterol; hipercolesterolemia; fígado; hepatoprotetor.

## Highlights

- O consumo do vinho tinto com e sem álcool, proporcionou menor acúmulo de lipídios em coelhos hipercolesterolêmicos.
- O vinho tinto sem álcool exibiu maior atividade das enzimas SOD e CAT.

- Os compostos fenólicos e o álcool do vinho tinto, são os responsáveis pelos benefícios na saúde.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos encontrados nos alimentos, principalmente em frutas, hortaliças e bebidas, têm despertado grande interesse devido às evidências sobre sua capacidade para ajudar a reduzir o risco de diferentes doenças, principalmente doenças cardiovasculares, diferentes tipos de câncer e diabetes (ALISSA; FERNS, 2017). As pesquisas relacionadas com o consumo de bebidas alcoólicas, especialmente do vinho tinto, são de interesse porque se acredita que o álcool exerça influência nas propriedades dos compostos bioativos, principalmente as antocianinas e o resveratrol.

Na década de 1980 se fez famoso o paradoxo francês, estudo que afirma que o mediterrâneo tem menor índice de mortes causadas por doenças cardiovasculares, embora tenham uma dieta rica em gordura, e que isto se deve ao consumo de vinho tinto. As pesquisas têm encontrado que o consumo de vinho tinto traz benefícios a saúde como redução do LDL no plasma sanguíneo, proteção contra o estresse oxidativo e protetor aterogênico, na obesidade (WANG et al., 2002; ZOU et al., 2003; HANSEN et al., 2005; KASDALLAH-GRISSA et al., 2007; NOGUER et al., 2012).

Não obstante, é sabido que o consumo excessivo de uma alta dosagem de álcool leva ao desenvolvimento de doenças como cirrose, doenças hepáticas gordurosa alcoólicas e esteatohepatites, pois a oxidação do álcool, induz a peroxidação lipídica nos hepatócitos (CABALLERÍA et al., 2012). Os medicamentos utilizados para diminuir o colesterol plasmático, são as estatinas, por meio da inibição da HMG CoA redutase, a enzima responsável pela síntese de colesterol. No entanto, há pesquisas que demonstram que o consumo das estatinas, tem efeitos colaterais na saúde como doenças relacionadas com o sistema muscular, problemas cognitivos e neurológicos (THOMPSON et al., 2016). Dessa maneira, é necessário buscar alternativas que ajudem na redução dos lipídios plasmáticos. Assim, o vinho tinto é uma alternativa, visto que ultimamente seu consumo tem se popularizado devido a seu alto conteúdo de compostos bioativos (antocianinas, resveratrol e entre outros) e que têm sido evidenciados em estudos

epidemiológicos (APOSTOLIDOU et al., 2015; NOGUER et al., 2012). Porém, existe ainda a dúvida se o seu efeito protetor é causado pela sinergia do álcool e os compostos fenólicos presentes no vinho tinto, e não só pela ação dos compostos fenólicos.

Portanto, avaliou-se o efeito hepatoprotetor do vinho tinto em diferentes concentrações de álcool (13 %, 8 % e 4 %) e vinho tinto sem álcool em coelhos hipercolesterolêmicos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras do vinho tinto**

Foi utilizado o vinho *Cabernet Sauvignon* tinto (2017), com 13 % de álcool, adquirido no mercado de Viçosa-MG. Para obter as diferentes dosagens do álcool no vinho tinto, realizou-se a evaporação no rotaevaporador IKA RV 8 (marca IKA), a uma temperatura de 40 °C. Por meio da densitometria se verificou a obtenção das porcentagens de 8 % e 4 % de álcool e sem álcool.

### **2.2. Ensaio biológico**

#### **2.2.1. Animais e dieta**

O trabalho foi realizado segundo as exigências éticas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de laboratório e aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 42/2018 - CEUA/UFV). Foram adquiridos do setor da cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, 30 coelhos machos albinos, de raça Nova Zelândia, entre 100 e 120 dias de vida e peso aproximado de 2,9 Kg. Os coelhos foram acondicionados em gaiolas individuais (45 x 52 x 60 cm), permanecendo em período de adaptação durante uma semana, mantidos em ambiente com controle de temperatura e umidade e com ciclos de luz/escuros por um período de 12 horas, e recebendo diariamente 120 g de ração comercial para coelhos (Presence) e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os coelhos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=5), recebendo diariamente a seguinte dieta:

**Tabela 1.** Tratamento dos animais experimentais.

<i>Grupos</i>	<i>Tratamentos</i>
<b>Grupo controle positivo (G1)</b>	Ração hipercolesterolêmica 0,5 % (120 g) (RH)
<b>Grupo 2 (G2)</b>	RH + 0,3 mg de sinvastatina · Kg · Dia <sup>-1</sup>
<b>Grupo 3 (G3)</b>	RH + 6 mL vinho tinto (13 %)
<b>Grupo 4 (G4)</b>	RH + 6 mL vinho tinto (8 %)
<b>Grupo 5 (G5)</b>	RH + 6 mL vinho tinto (4 %)
<b>Grupo 6 (G6)</b>	RH + 6 mL vinho tinto sem álcool

Fonte. Alviarez, 2019.

A dieta hipercolesterolêmica foi fornecida diariamente por um período de 30 dias e as doses do vinho tinto e a sinvastatina, foram calculadas segundo a doses recomendada para uma pessoa de 70 kg, sendo que a dose recomendada de vinho tinto é de 150 mL (DI CASTELNUOVO et al., 2002) e 10 mg de sinvastatina. Essas dosagens do vinho tinto e a sinvastatina foram administradas por gavagem oral. A ração hipercolesterolêmica foi produzida pelo enriquecimento de ração comercial padrão (Presence, Brasil) com 0,5 % de colesterol cristalino (m·m<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, USA). Para facilitar a gavagem aos animais, uma solução de sinvastatina foi preparada em farmácia de manipulação.

### 2.2.2. Coleta do sangue e tecido

Os animais foram submetidos a três coletas do sangue na veia marginal da orelha (0, 15 e 30 dias). Foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue em tubos heparinizados, após 12 horas de jejum. As amostras foram centrifugadas a 148 RCF por 15 minutos para separação do plasma e armazenadas a -80 °C até a realização das análises bioquímicas. Aos trinta dias, realizou-se a eutanásia dos coelhos com o uso de relaxante muscular xilazina (10 mg/kg) e quetamina (50 mg/kg) e com o uso de anestesia geral barbitúrica com tiopental sódico (3 mg/kg), por via intramuscular, sendo então realizada a exsanguinação (punção cardíaca). Os fígados foram coletados. Lavados em solução salina e pesados em balança analítica. Um fragmento do lobo esquerdo do fígado foi colocado em solução fixadora de paraformaldeído (4 %) para realização das análises histopatológicas.

### **2.2.3. Medidas biométricas**

A variação do peso (PC) foi calculada mediante a diferença entre o peso inicial e o peso final dos animais do experimento. O índice hepatossomático (IHS) foi obtido pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal no dia da eutanásia ( $IHS = \text{Peso fígado} / \text{Peso corporal} * 100$ ).

A densidade do fígado foi determinada pela deslocação de volume de um fragmento de fígado com peso conhecido em água. Calculou-se o número total de hepatócitos no fígado pela relação entre o volume do fígado (VF) e o volume do hepatócito (VH) ( $\text{número de hepatócitos} = (VF/VH) * 100$ ).

### **2.2.4. Análises dos parâmetros bioquímicos**

Foram determinadas no plasma sanguíneo as concentrações de AST, ALT,  $\gamma$ -GT, lipase, a fosfatase alcalina (ALP), proteínas totais, creatinina e albumina, utilizando kits comerciais (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) em analisador bioquímico BS200E (Mindray, Shenzhen, China).

## **2.3. Biomarcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica**

As amostras do fígado congeladas em nitrogênio líquido, foram utilizadas para a preparação dos homogenatos, na proporção de 200 mg de tecido por 1 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), sendo homogeneizados (MA102/Mini, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) e posteriormente centrifugados a  $12000 \times g$ , a 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas análises, que foram realizadas em duplicata. A concentração de proteína total no tecido hepático foi determinada usando o método de (LOWRY et al., 1951).

### **2.3.1. Ensaio da atividade superóxido dismutase (SOD)**

Foi realizado segundo a metodologia de Madesh e Balasubramanian (1998) com modificações. Foram utilizados 30  $\mu\text{L}$  do homogeneizado das amostras de fígado, 99  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio ( $0,2 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7,0), 6  $\mu\text{L}$  de MTT (3-(4,5 dimethyl thiazol 2-yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide) ( $1,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e 15  $\mu\text{L}$  de pirogalol. Posteriormente essa mistura foi incubada a 37 °C durante 10 minutos e a reação foi finalizada adicionando-se 150  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido

(DMSO) e realizando a leitura a 570 nm sendo os resultados expressos em U SOD·mg proteína<sup>-1</sup>.

### **2.3.2. Atividade da catalase (CAT)**

Foram utilizados 10 µL de homogenato do fígado sendo adicionado 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mmol·L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato de potássio (0,2 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7,0) e homogeneizando. Posteriormente, foi observada a redução da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, durante 60 segundos, sendo os resultados expressos em U CAT·mg proteína<sup>-1</sup> (AEBI, 1984).

### **2.3.3. Atividade da glutationa-s-transferase (GST)**

Realizado segundo a metodologia de Habig, Pabst & Jakoby (1974). Para isto, foi preparado o meio de reação com 700 µL de tampão fosfato (0,2 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7,0), 10 µL de CDNB (1-cloro-dinitro-benzeno, 1 mmol·L<sup>-1</sup>), 10 µL de GSH (glutathiona reduzida, 1 mmol·L<sup>-1</sup>), sendo posteriormente adicionado 10 µL do homogenato do fígado. A reação foi observada em comprimento de onda 340 nm e os resultados foram expressos em µmol·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>.

### **2.3.4. Peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS (substância reativa do ácido tiobarbitúrico)**

Segundo a metodologia de Wallin et al. (1993), 0,2 mL da amostra homogeneizada do fígado foi colocado com 0,4 mL da solução de trabalho (TCA, ácido tricloroacético 15 %, TBA, ácido tiobarbitúrico 0,375 % e ácido clorídrico 0,25 mol·L<sup>-1</sup>), sendo posteriormente aquecida a 90 °C durante 40 minutos. A seguir, as amostras passaram por banho de gelo durante 10 minutos e foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi lido na absorbância de 532 nm em microplacas de 96 poços. A quantificação do TBARS se realizou mediante a interpolação da curva padrão com malonaldeído (MDA) e os resultados foram expressos em µmol MDA·mg tecido<sup>-1</sup>.

### **2.3.5. Determinação de proteína carbonilada**

O pellet do homogenato do fígado, foi resuspenso em TCA (10 %) em duas etapas de 500 µL cada, utilizando vórtex para agitar. A solução foi dividida em 2 tubos de eppendorf (um para amostra e outro para o branco) e centrifugada

a 3000 rpm durante 10 minutos a 15 °C. Após o descarte do sobrenadante foi adicionado 500 µL DNPH (0,01 nmol) para a amostra e 500 µL HCl (2 mol·L<sup>-1</sup>) para o branco. Posteriormente, foram agitados no vórtex e incubados no escuro a temperatura ambiente, agitando novamente aos 15 minutos e aos 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a 15 °C e o sobrenadante descartado. Foram realizadas 3 lavagens consecutivas, com 1 mL de acetato de etila e etanol (1:1), agitando em vortex, centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos a 15 °C, descartando o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 1 mL SDS (6 %) a cada tubo de eppendorf, centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos a 15 °C. Foram pipetados 200 µL do sobrenadante na placa da amostra e do branco da amostra e a leitura feita a 370 nm (LEVINE et al., 1990).

## **2.4. Avaliação histológica e morfométrica do fígado**

### **2.4.1. Inclusão em resina**

Os fragmentos do fígado foram fixados em solução de paraformaldeído (4 %) durante 24 horas e posteriormente transferidos para álcool 70%. Para a inclusão em resina, os fragmentos hepáticos foram desidratados em soluções crescentes de etanol (80 %, 90 %, 95 % e 100 %), com trocas cada 30 minutos, realizando-se a inclusão em glicolmetacrilato (Historesin®, Leica). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados, com intervalo de 15 µm, com 3 µm de espessura utilizando o micrótomo rotativo (Leica) e navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1 % (m/v) e montadas com Entellan® sendo as imagens obtidas pelo uso do fotomicroscópio de campo claro (Olympus, BX-53, Tóquio, Japão), em objetiva de 40X.

### **2.4.2. Morfometria do fígado**

O tecido hepático foi avaliado pelo método morfométrico, utilizando uma grade de 494 pontos em 10 campos, observando-se um total de 4940 pontos por animal, em aumento de 200 x. Nesse estudo, foram quantificados os elementos constituintes do fígado nos cortes histológicos, destacando-se hepatócitos, capilares sinusoides, infiltrado inflamatório e célula endotelial. Para esses componentes foram determinadas as proporções volumétricas (%) utilizando a seguinte relação:

$$\frac{P_C}{P_T} \times 100$$

$P_C$ : número de pontos sobre a estrutura de interesse e  $P_T$ : total de pontos de teste na área histológica. Para as gotículas de lipídios, o  $P_T$  é o total de pontos sobre hepatócitos (Cupertino et al., 2013; Novaes et al., 2012).

Após as determinações das proporções volumétricas, foram medidos os diâmetros de 25 núcleos dos hepatócitos por animal. Foram calculados o volume nuclear (equação 2), citoplasmático (equação 3) e celular (equação 4) dos hepatócitos e o diâmetro nuclear.

$$volume\ nuclear = \frac{4}{3} * \pi r^3 \quad \text{equação 2}$$

$$volume\ citoplasmático = \frac{\%citoplasma * volume\ nuclear}{\%nucleos} \quad \text{equação 3}$$

$$volume\ celular\ (hepatócito) = volume\ nuclear + volume\ citoplasmático$$

equação 4

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa de análise de imagens Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetcs, Rockville, USA).

O desenvolvimento de esteatose foi avaliado semiquantitativamente utilizando uma escala de 5 graus: grau 0, se a porcentagem de gordura nos hepatócitos for < 5 %; grau 1, se ≥ 5 % e < 25 %; grau 2, se ≥ 25 % e < 50 %; grau 3, se ≥ 50 % e < 75 %; e grau 4, se ≥ 75 % (TURLIN et al., 2009).

## 2.5. Análise estatística

Após dos testes de normalidade foi realizado a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação das medias entre os grupos experimentais. Todos os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (DP). O nível de significância considerado foi de  $p \leq 0,05$  e para o analise dos biomarcadores de estresse oxidativo o nível de significância utilizado foi  $p \leq 0,10$ .

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Efeito do vinho tinto nos marcadores hepáticos**

Os coelhos foram alimentados com a dieta hipercolesterolêmica durante 30 dias e foram fornecidos com vinho tinto em diferentes dosagens de álcool para avaliar o seu efeito nos marcadores hepáticos, no capítulo um foi mostrado que a dieta hipercolesterolêmica aumentou os níveis plasmáticos de Ct, LDL e TG.

Na tabela 2 são mostrados os resultados das AST, ALT,  $\gamma$ GT e a lipase. Foi observado que a AST aumentou no grupo do vinho tinto sem álcool, em relação com o G1 e G3 ( $p \leq 0,05$ ) após 15 dias de iniciado o experimento. Ao longo do experimento em cada grupo não houve mudanças no ALT. A lipase aumentou nos 15 e 30 dias, no G3 comparado com o valor inicial. A  $\gamma$ GT aumentou em todos os grupos durante o experimento e a ALP aumento para o G2 e G5 e no G6 só aumentou aos 15 dias.

**Tabela 2.** – Efeito da ingestão da dieta hipercolesterolêmica e o consumo de vinho tinto nas concentrações das enzimas plasmáticas AST, AL T,  $\gamma$ -GT, lipase e fosfatase alcalina

<i>Parâmetros</i>	<i>Tempo (dias)</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>
<i>AST (U.L<sup>-1</sup>)</i>	<b>0</b>	82,8±22,75 <sup>aA</sup>	97,8±25,58 <sup>aA</sup>	98,4±28,64 <sup>aA</sup>	108±38,37 <sup>aA</sup>	107±26,51 <sup>aA</sup>	128,2±32,67 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	37,2±19,83 <sup>aB</sup>	82±78,37 <sup>abA</sup>	22,4±12,52 <sup>aB</sup>	85,6±51,72 <sup>aA</sup>	77,28±51,29 <sup>abA</sup>	134±71,80 <sup>bA</sup>
	<b>30</b>	53,2±33,54 <sup>aA</sup>	78,4±68,34 <sup>aA</sup>	18,2±18,44 <sup>aB</sup>	51,2±34,95 <sup>aA</sup>	66,00±32,15 <sup>aA</sup>	86,8±90,48 <sup>aA</sup>
<i>ALT (U.L<sup>-1</sup>)</i>	<b>0</b>	49,4±11,24 <sup>aA</sup>	97,6±24,25 <sup>aA</sup>	82±26,76 <sup>aA</sup>	99,8±58,54 <sup>aA</sup>	75,2±9,36 <sup>aA</sup>	104,8±77,03 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	41,60±31,79 <sup>aA</sup>	53,60±36,81 <sup>aA</sup>	44,4±20,71 <sup>aA</sup>	82,00±39,47 <sup>aA</sup>	37,2±34,97 <sup>aA</sup>	103,2±53,19 <sup>aA</sup>
	<b>30</b>	29,24±21,55 <sup>aA</sup>	59,20±35,96 <sup>aA</sup>	44,00±22,27 <sup>aA</sup>	34,40±35,84 <sup>aA</sup>	46,80±23,26 <sup>aA</sup>	51,60±21,37 <sup>aA</sup>
<i><math>\gamma</math>-GT (U.L<sup>-1</sup>)</i>	<b>0</b>	14,00±0,70 <sup>aA</sup>	17,4±3,05 <sup>aA</sup>	13,6±1,67 <sup>aA</sup>	15,6±3,05 <sup>aA</sup>	15,8±1,30 <sup>aA</sup>	17,4±2,19 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	167,20±65,37 <sup>aB</sup>	129,60±37,08 <sup>aB</sup>	183,20±37,72 <sup>aB</sup>	159,60±49,46 <sup>aB</sup>	129,20±39,38 <sup>aB</sup>	107,6±68,97 <sup>aA</sup>
	<b>30</b>	235,20±79,13 <sup>aB</sup>	215,60±61,47 <sup>aC</sup>	248,00±34,98 <sup>aC</sup>	177,60±90,29 <sup>aB</sup>	234,80±38,04 <sup>aC</sup>	197,60±65,35 <sup>aB</sup>
<i>Lipase (U.L<sup>-1</sup>)</i>	<b>0</b>	174,60±28,58 <sup>aA</sup>	210,20±70,30 <sup>aA</sup>	158,80±25,73 <sup>aA</sup>	152,80±23,49 <sup>aA</sup>	158,40±25,12 <sup>aA</sup>	162,00±29,59 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	218,00±40,74 <sup>aA</sup>	256,00±107,59 <sup>aA</sup>	211,60±11,78 <sup>aB</sup>	188,00±29,01 <sup>aA</sup>	218,40±59,06 <sup>aA</sup>	208,00±28,91 <sup>aA</sup>
	<b>30</b>	215±82,71 <sup>aA</sup>	222,8±107,15 <sup>aA</sup>	204,8±36,51 <sup>aB</sup>	183±89,63 <sup>aA</sup>	160,8±46,27 <sup>aA</sup>	194,8±82,25 <sup>aA</sup>
<i>ALP (U.L<sup>-1</sup>)</i>	<b>0</b>	186±59,90 <sup>aA</sup>	190,2±40,87 <sup>aA</sup>	176,4±32,60 <sup>aA</sup>	161,8±31,67 <sup>aA</sup>	190,6±42,40 <sup>aA</sup>	195,8±21,16 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	231,2±51,55 <sup>aA</sup>	360,4±39,04 <sup>aB</sup>	236,8±47,17 <sup>aA</sup>	275,2±85,48 <sup>aA</sup>	280,8±29,31 <sup>aB</sup>	366±153,04 <sup>aB</sup>
	<b>30</b>	261,2±69,23 <sup>aA</sup>	314,8±80,44 <sup>aB</sup>	280,4±109,36 <sup>aA</sup>	253,2±85,30 <sup>aA</sup>	290±81,96 <sup>aB</sup>	234±40,89 <sup>aA</sup>

G1. hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Medias com letras minúsculas diferentes na linha difere significativamente e letras maiúsculas diferentes na coluna mostra diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste de SNK (p≤0,05).

Fonte. Alviarez, 2019.

### **3.2.Efeito do consumo do vinho tinto com e sem álcool nos parâmetros bioquímicos da função renal**

Como se observa na tabela 3, não foi encontrado diferenças significativas nos valores dos parâmetros de proteínas totais, albumina e a creatinina entre os grupos avaliados. Não obstante, foi evidenciado aumento no teor de proteínas totais ao longo do tempo nos grupos experimentais a exceção do G4. Também foi observado que a albumina aumentou ao longo do tempo nos grupos G2, G3, G5 e G6. A creatinina diminui ao longo do tempo de experimento no G3.

**Tabela 3.** Efeito da ingestão de dieta hipercolesterolêmica e do fornecimento do vinho tinto nas concentrações plasmáticas de proteínas totais, albumina e creatinina.

<i>Parâmetros</i>	<i>Tempo</i> <i>(dias)</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>
<i>Proteínas</i> <i>totais</i> <i>(g/mL)</i>	<b>0</b>	5,34±0,13 <sup>aA</sup>	5,4±0,35 <sup>aA</sup>	5,54±0,18 <sup>aA</sup>	5,26±0,34 <sup>aA</sup>	5,36±0,30 <sup>aA</sup>	5,48±0,18 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	15,64±6,39 <sup>aB</sup>	20,72±10,47 <sup>aB</sup>	17,68±4,34 <sup>aB</sup>	16,84±6,68 <sup>aA</sup>	15,52±3,90 <sup>aB</sup>	23,36±14,97 <sup>aB</sup>
	<b>30</b>	15,96±6,35 <sup>aB</sup>	21,24±10,12 <sup>aB</sup>	19,48±3,51 <sup>aB</sup>	17,56±14,28 <sup>aA</sup>	23,24±11,56 <sup>aB</sup>	18,6±6,26 <sup>aB</sup>
<i>Albumina</i> <i>(g/dL)</i>	<b>0</b>	3,06±0,09 <sup>aA</sup>	3,12±0,08 <sup>aA</sup>	3,2±0,07 <sup>aA</sup>	2,96±0,09 <sup>aA</sup>	3,16±0,15 <sup>aA</sup>	3,18±0,24 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	4,04±1,76 <sup>aA</sup>	5,64±1,31 <sup>aB</sup>	5,00±0,79 <sup>aB</sup>	4,76±0,82 <sup>aA</sup>	4,72±0,56 <sup>aB</sup>	6,52±2,42 <sup>aB</sup>
	<b>30</b>	4,68±0,94 <sup>aA</sup>	5,24±1,60 <sup>aB</sup>	5,2±0,53 <sup>aB</sup>	4,44±1,91 <sup>aA</sup>	5,28±1,28 <sup>aB</sup>	4,96±1,28 <sup>aAB</sup>
<i>Creatinina</i> <i>(mg/dL)</i>	<b>0</b>	0,92±0,07 <sup>aB</sup>	0,94±0,02 <sup>aB</sup>	1,05±0,15 <sup>aA</sup>	0,93±0,11 <sup>aB</sup>	0,97±0,04 <sup>aB</sup>	1,00±0,17 <sup>aA</sup>
	<b>15</b>	0,31±0,24 <sup>aA</sup>	0,37±0,24 <sup>aA</sup>	0,21±0,32 <sup>aAB</sup>	0,15±0,24 <sup>aA</sup>	0,25±0,29 <sup>aA</sup>	0,68±0,63 <sup>aA</sup>
	<b>30</b>	1,15±0,59 <sup>aB</sup>	0,85±0,48 <sup>aB</sup>	0,64±0,68 <sup>aB</sup>	0,67±0,32 <sup>aB</sup>	0,70±0,22 <sup>aB</sup>	0,52±0,45 <sup>aA</sup>

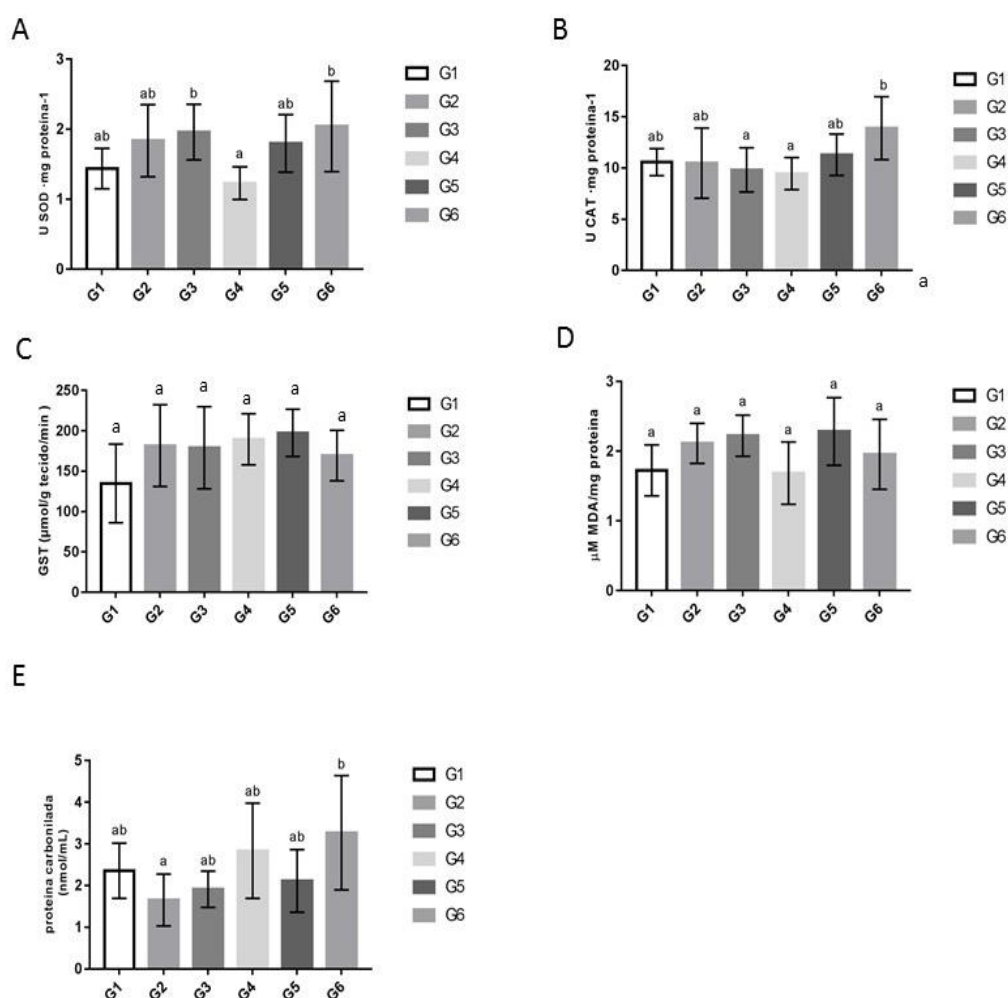
G1. hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina·kg·dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Médias com letras minúsculas diferentes na linha difere significativamente e letras maiúsculas diferentes na coluna mostra diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste de SNK (p≥0,05).

Fonte. Alviarez, 2019.

### 3.3. Biomarcadores do estresse oxidativo no tecido hepático

A atividade das enzimas SOD, CAT e GST são mostradas na figura 1A, 1B, 1C. O G4 apresentou redução da atividade da enzima SOD em relação ao G3 e G6. Na atividade da enzima CAT, o G6 aumentou em relação ao G3 e G4. Na figura 1D, não houve alteração na redução da peroxidação lipídica no MDA, mas na figura 1E, o G6 teve aumento da produção da proteína carbonilada em relação ao G2 ( $p \leq 0,10$ ).

**Figura 1.** Biomarcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica em coelhos alimentados com ração hipercolesterolêmica.



(A). Atividade de superóxido dismutase (SOD). (B). Atividade da Catalase. (C). Atividade da Glutationa-s-transferase. (D). Peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS, MDA. (E). Proteína carbonilada. G1. ração hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Letras minúsculas diferentes na linha difere significativamente, pelo teste SNK ( $p \leq 0,10$ ).

Fonte. Alvarez, 2019.

### 3.4. Parâmetros biométricos

Os parâmetros biométricos são mostrados na tabela 4. Na variação do peso corporal o G3 e G5 aumentaram em relação a G4 e G6. O peso do fígado foi maior no G5 em relação ao G4. A densidade do fígado foi maior no G5 foi diferente aos outros grupos e o G6 foi maior comparado com o G1 e G2. Não houve diferenças significativas no peso corporal, no volume do fígado, no índice hepatossomático e no número de hepatócitos entre os grupos.

**Tabela 4.** Parâmetros biométricos do fígado em coelhos fornecidos com vinho tinto em diferentes dosagens de álcool

Parâmetros	G1	G2	G3	G4	G5	G6
PCI	3,09±0,14 <sup>a</sup>	2,93±0,25 <sup>a</sup>	2,72±0,15 <sup>a</sup>	2,94±0,28 <sup>a</sup>	2,89±0,16 <sup>a</sup>	3,15±0,28 <sup>a</sup>
PCF	3,17±0,18 <sup>a</sup>	3,02±0,3 <sup>a</sup>	3,14±0,20 <sup>a</sup>	2,85±0,33 <sup>a</sup>	3,27±0,21 <sup>a</sup>	2,96±0,26 <sup>a</sup>
VP	0,08±0,2 <sup>ab</sup>	0,07±0,44 <sup>ab</sup>	0,42±0,1 <sup>b</sup>	-0,1±0,1 <sup>a</sup>	0,38±0,05 <sup>b</sup>	-0,20±0,2 <sup>a</sup>
PF	119,2±10,55 <sup>ab</sup>	103,2±26,85 <sup>ab</sup>	105,6±21,84 <sup>ab</sup>	86±21,86 <sup>a</sup>	134,6±8,53 <sup>b</sup>	119,6±26,32 <sup>ab</sup>
DF	1,03±0,04 <sup>a</sup>	1,03±0,02 <sup>a</sup>	1,06±0,02 <sup>ab</sup>	1,07±0,04 <sup>ab</sup>	1,21±0,11 <sup>c</sup>	1,14±0,06 <sup>b</sup>
VF	115,40±12,76 <sup>a</sup>	100,69±27,13 <sup>a</sup>	99,91±21,03 <sup>a</sup>	80,14±20,68 <sup>a</sup>	111,26±10,54 <sup>a</sup>	104,6±20,74 <sup>a</sup>
IHS	3,76±0,28 <sup>a</sup>	3,42±1,00 <sup>a</sup>	3,35±0,60 <sup>a</sup>	2,98±0,51 <sup>a</sup>	4,13±0,40 <sup>a</sup>	4,09±1,11 <sup>a</sup>
N° HEP	219,05*10 <sup>-10</sup> ±	225,33*10 <sup>-10</sup> ±	259,55*10 <sup>-10</sup> ±	270,50*10 <sup>-10</sup> ±	269,05*10 <sup>-10</sup> ±	227,61*10 <sup>-10</sup> ±
	450,54*10 <sup>-9a</sup>	423,00*10 <sup>-9a</sup>	712,81*10 <sup>-9a</sup>	101,24*10 <sup>-10a</sup>	567,11*10 <sup>-9a</sup>	323,89*10 <sup>-9a</sup>

G1. ração hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. PCI= peso corporal inicial (k); PCF= peso corporal final (k); VP= Variação de peso (k); PF= Peso do fígado (g); DF= Densidade do fígado (g.mL<sup>-1</sup>); VF= Volume do fígado (mL); IHS= Índice hepatossomático; N° HEP= Número de hepatócitos. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Letras minúsculas diferentes na linha difere significativamente, pelo teste SNK (p≤0,05).

Fonte. Alvarez, 2019.

### 3.5. Efeito das diferentes porcentagens de álcool do vinho tinto na estereologia e histomorfometria hepática

Na tabela 5, são mostrados os dados de histomorfometria e histopatologia hepáticas. Não houve diferença no percentual de núcleos, bi núcleos, hepatócitos, macrófagos, célula endotelial e infiltrado inflamatório. Houve redução do percentual de acúmulo de lipídios e aumento de citoplasma nos grupos fornecidos com vinho tinto com e sem álcool em relação ao G1, também o G3 e G4 em relação ao G2. Na classificação do desenvolvimento de esteatose, os grupos

fornechos com vinho tinto com e sem álcool e a sinvastatina apresentaram esteatose em primeiro grau e o G1 com desenvolvimento da esteatose em segundo grau.

**Tabela 5.** Parâmetros histomorfométricos do tecido hepático de coelhos fornechos com vinho tinto em diferentes porcentagens de álcool

%	G1	G2	G3	G4	G5	G6
<i>Núcleo</i>	3,57±0,46 <sup>a</sup>	3,96±0,53 <sup>a</sup>	3,73±0,25 <sup>a</sup>	4,37±0,58 <sup>a</sup>	4,12±0,53 <sup>a</sup>	3,67±0,56 <sup>a</sup>
<i>Bi núcleos</i>	1,11±0,29 <sup>a</sup>	0,99±0,27 <sup>a</sup>	1,28±0,33 <sup>a</sup>	1,28±0,12 <sup>a</sup>	0,99±0,36 <sup>a</sup>	1,10±0,31 <sup>a</sup>
<i>Tri núcleos</i>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,008±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,04±0,0 <sup>a</sup>	0,02±0,04 <sup>a</sup>	0,01±0,03 <sup>a</sup>
<i>Citoplasma</i>	75,59±2,98 <sup>a</sup>	72,49±5,34 <sup>b</sup>	73,79±4,9 <sup>c</sup>	75,38±1,71 <sup>c</sup>	73,71±4,96 <sup>bc</sup>	73,43±2,77 <sup>bc</sup>
<i>GL</i>	34,65±4,42 <sup>c</sup>	24,22±6,48 <sup>b</sup>	15,92±4,10 <sup>a</sup>	14,81±5,49 <sup>a</sup>	19,43±3,08 <sup>ab</sup>	18,36±3,30 <sup>ab</sup>
<i>Hepatócitos</i>	80,27±2,74 <sup>a</sup>	77,44±4,89 <sup>a</sup>	78,81±5,11 <sup>a</sup>	81,03±1,51 <sup>a</sup>	78,84±4,96 <sup>a</sup>	78,12±2,88 <sup>a</sup>
<i>CS</i>	15,86±3,13 <sup>a</sup>	16,47±5,50 <sup>a</sup>	17,29±5,20 <sup>a</sup>	15,33±1,50 <sup>a</sup>	17,11±3,30 <sup>a</sup>	16,11±1,91 <sup>a</sup>
				a		
<i>Macrófagos</i>	1,20±0,53 <sup>a</sup>	1,18±0,27 <sup>a</sup>	1,47±0,27 <sup>a</sup>	1,46±0,26 <sup>a</sup>	1,29±0,3 <sup>a</sup>	1,37±0,16 <sup>a</sup>
<i>Infiltrado</i>	1,54±0,90 <sup>a</sup>	1,52±1,8 <sup>a</sup>	1,53±1,17 <sup>a</sup>	1,66±0,80 <sup>a</sup>	2,23±1,78 <sup>a</sup>	3,08±1,42 <sup>a</sup>
<i>Endotelial</i>	0,67±0,26 <sup>a</sup>	0,66±0,27 <sup>a</sup>	0,44±0,23 <sup>a</sup>	0,47±0,14 <sup>a</sup>	0,53±0,21 <sup>a</sup>	0,75±0,52 <sup>a</sup>
<i>Colágeno</i>	0,47±0,47 <sup>a</sup>	2,28±1,28 <sup>b</sup>	0,44±0,82 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0,46±0,63 <sup>a</sup>

GL. Gotícula de lipídios. CS. Capilar sinusoide. G1. hipercolesterolêmica); G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Letras diferentes na linha difere significativamente pelo teste SNK (p≤0.05).

Fonte. Alvarez, 2019.

Os dados da esteireologia hepática são mostrados na tabela 6. Os animais que receberam somente a dieta hipercolesterolêmica apresentaram aumento do diâmetro e volume nuclear. Houve diminuição do volume citoplasmático e celular no G3 e G4 em relação ao G1. O G4 foi diferente dos outros grupos no diâmetro e volume nuclear; e do volume citoplasmático e celular em relação ao G6 (p≤0,05).

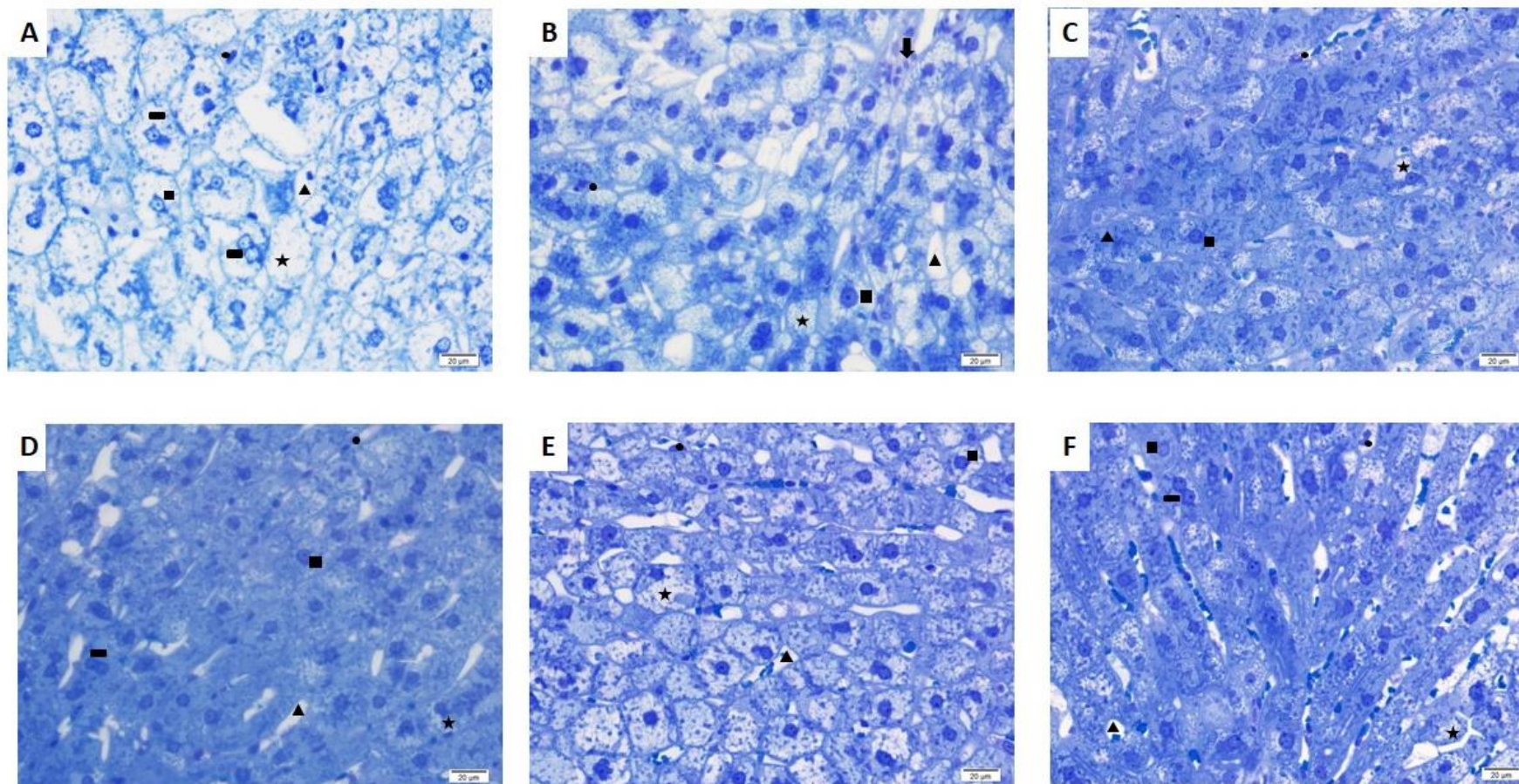
**Tabela 6.** Parâmetros estereológicos hepáticos de coelhos hipercolesterolêmicos fornecidos com o vinho tinto em diferentes concentrações de álcool

<i>Grupo</i>	<i>Diâmetro nuclear (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Volume nuclear (<math>\mu\text{m}^3</math>)</i>	<i>Volume citoplasmático (<math>\mu\text{m}^3</math>)</i>	<i>Volume celular (<math>\mu\text{m}^3</math>)</i>
<b>G1</b>	7,80±0,26 <sup>c</sup>	248,42±25,06 <sup>c</sup>	4093,2 ±788,85 <sup>c</sup>	4341,60±799,17 <sup>c</sup>
<b>G2</b>	7,45±0,41 <sup>bc</sup>	218,26±34,60 <sup>bc</sup>	3227,71±616,17 <sup>abc</sup>	3445,96±632,19 <sup>abc</sup>
<b>G3</b>	7,19±0,16 <sup>ab</sup>	195,27±12,60 <sup>a</sup>	2878,71±182,71 <sup>ab</sup>	3073,98±189,13 <sup>ab</sup>
<b>G4</b>	6,89±0,29 <sup>a</sup>	171,78±21,18 <sup>a</sup>	2311,35±351,32 <sup>a</sup>	2483,14±363,59 <sup>a</sup>
<b>G5</b>	7,42±0,18 <sup>bc</sup>	214,06±15,60 <sup>bc</sup>	3133,51±645,76 <sup>abc</sup>	3347,57±660,81 <sup>abc</sup>
<b>G6</b>	7,40±0,19 <sup>bc</sup>	212,62±17,64 <sup>bc</sup>	3388,75±581,71 <sup>bc</sup>	3601,37±594,13 <sup>bc</sup>

G1. ração hipercolesterolêmica; G2. ração hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina· kg· dia<sup>-1</sup>; G3. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 13 %; G4. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 8 %; G5. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto 4 %; G6. ração hipercolesterolêmica + 6 mL vinho tinto sem álcool, durante 30 dias. Os dados são expressos como a média± desvio padrão (n=5). Letras minúsculas diferentes na coluna difere significativamente, pelo teste SNK (p≤0,05).

Fonte. Alviarez, 2019.

Na figura 2, são mostradas as fotomicrografias representativas do fígado dos coelhos hipercolesterolêmicos com fornecimento de sinvastatina e as diferentes dosagens de álcool no vinho tinto. Podem ser observados os núcleos dos hepatócitos, hepatócitos binucleados, gotículas lipídicas, macrófagos e capilar sinusoide. Na figura 2A, se observa que o G1 apresentou maior acúmulo de lipídios nos hepatócitos, levando os núcleos até a periferia e perdendo a organização estrutural dos hepatócitos em relação aos outros grupos. Na figura 2B, é mostrado o efeito do fornecimento da sinvastatina no tecido hepático, sendo que houve menor acúmulo de lipídios em relação ao G1, no entanto, os grupos que receberam o vinho tinto com e sem álcool apresentaram menor acúmulo de lipídios e conservaram a organização estrutural dos hepatócitos (2C, 2D, 2E e 2F).



**Figura 2.** Fotomicrografias dos cortes histológicos do tecido hepático em coelhos alimentados com a dieta hipercolesterolêmica, vinho tinto (13 %, 8 %, 4 %); vinho evaporado e sinvastatina.

Mostrando núcleo (■); binúcleo (▬); gotículas de gordura (★); capilar sinusoide (▲); infiltrado inflamatório (▼); macrófago (●). Coloração = azul de toluidina - borato de sódio. (A) G1 = dieta hipercolesterolêmica 0,5 %; (B) G2 = dieta hipercolesterolêmica + 0,3 mg sinvastatina · kg peso; (C) G3 = dieta hipercolesterolêmica + vinho tinto 13 %; dieta hipercolesterolêmica + vinho tinto 8 %; dieta hipercolesterolêmica + vinho tinto 4 %; dieta hipercolesterolêmica + vinho tinto evaporado por 30 dias.

Fuente. Alvarez, 2019.

#### 4. Discussão

As enzimas hepáticas são utilizadas para diagnosticar danos hepáticos inespecíficos como a esteatose, DHNG, cirroses, sendo a ALT considerada mais específica por encontrar-se no citosol dos hepatócitos, já que a AST é encontrada em vários tecidos como coração, fígado, musculo esquelético, rim e cérebro. No fígado está localizada na mitocôndria e no citosol e seu aumento geralmente é indicador de doença hepática (DASGUPTA, 2015).

A ALP, também é dosada junto com a AST e ALT para determinar doenças hepatobiliar, sendo encontrada na membrana canalicular e sinusoidal do fígado, além dos ossos, intestino e placenta (DASGUPTA, 2015). Os valores de ALP aumentaram após o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica e as dosagens do vinho tinto. Destaca-se que os valores aumentaram significativamente com os valores iniciais nos grupos da sinvastatina 89,5 % e 65,51 %; o G4 foi 70,0 % e 56,5 %, no G5 foi maior 86,9 % e 19,51 %, comparado com o valor inicial aos 15 e 30 dias respectivamente e com o G3 aumentou 59 %. Esses resultados podem ser a consequência da reação das dosagens realizadas, que poderia ter influenciado em uma obstrução biliar o que levou a uma maior sínteses da ALP nos hepatócitos (PATHEGUINI, M. & BAIS, 2018).

A gama-glutamil transferase ( $\gamma$ GT) é uma glicoproteína de membrana, encontrada na superfície da membrana celular dos hepatócitos, rim, pâncreas, baço, vesícula biliar, cérebro e vesículas seminais, mas só a  $\gamma$ GT do fígado é detectável no soro. Atua como catalisador do antioxidante glutathiona e é utilizada como biomarcador de consumo de álcool, sendo determinada junto com a AST e ALT, para obter resultados mais confiáveis em relação à determinação dos danos hepáticos. Normalmente, o aumento da  $\gamma$ GT, está relacionado ao consumo de álcool, mas também para doenças como a hipertensão, doença cardiovascular ou diabetes tipo 2, doença isquêmica, obesidade, doenças no fígado e vias biliares (ARAÚJO; LIMA; DALTRO, 2005; ÇAYLI et al., 2014; DASGUPTA, 2015; MASON; STARKE; VAN KIRK, 2010; TARGHER, 2010; WHITFIELD, 2001).

A  $\gamma$ GT teve notório aumento em todos os grupos avaliados, comparado com os valores iniciais ( $P \leq 0,05$ ), o que indica que o fornecimento da dieta

hipercolesterolêmica e provavelmente as dosagens do vinho tinto e da sinvastatina, influenciaram no parâmetro avaliado, já que o aumento na atividade da  $\gamma$ GT no soro pode refletir a ação do álcool e o uso de drogas, em efeitos tóxicos nas estruturas microssomais das células do fígado (PATHEGUINI, M. & BAIS, 2018).

Embora não houvesse diferenças entre os grupos, novamente o G4 percentualmente exibiu valores menores 24,50 % e 28,40 % comparado com o G1 e o G3 respectivamente. Afirmando nossa hipótese, de que o nível moderado de álcool e os compostos bioativos atuam sinergicamente ajudando na proteção hepática, sendo confirmado na histologia, que mostra menor acúmulo de gotículas de gordura no grupo fornecido com o vinho tinto 8 %.

O aumento da ALP e  $\gamma$ GT no trabalho, estão relacionado como o desenvolvimento da doença colestase, caracterizada pela incapacidade da secreção da bilis, composta pelas sais biliares, fosfolípidios, colesterol, bilirrubina e proteínas, o que poderia estar relacionado com a elevação do colesterol (IBÁÑEZ SAMANIEGO; DÍAZ RUÍZ, 2016).

A lipase é um biomarcador sérico, sua função no metabolismo das lipoproteínas é hidrolisar os triglicérides dos quilomícrons e VLDL (FEINGOLD; GRUNFELD, 2000; ICHIKAWA et al., 2004; JANSEN; VERHOEVEN; SIJBRANDS, 2002). Neste estudo, somente o G3 apresentou aumento da lipase comparado com o valor inicial, não obstante, percentualmente foi observado aumento da lipase nos outros grupos após de começado o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica. Estudos anteriores, tem reportado que há uma relação inversa entre os níveis de HDL e a lipase. O aumento de atividade, faz com que seja aumentado o LDL, devido à hidrolise do VLDL em IDL que posteriormente é metabolizado em LDL (FEINGOLD; GRUNFELD, 2000); sendo considerado a lipase tanto anti como pro-aterogênico (ICHIKAWA et al., 2004; JANSEN; VERHOEVEN; SIJBRANDS, 2002); pois no estudo foi evidenciado que o consumo do vinho tinto com e sem álcool, os níveis de HDL permaneceram inalterados (dados mostrados no capítulo um), possivelmente devido ao aumento da lipase.

As determinações plasmáticas de proteínas totais, albumina e creatinina, foram avaliadas para determinar se houve possíveis alterações das funções renais em coelhos fornecidos com vinho tinto com e sem álcool. A diminuição da concentração de albumina e proteínas totais também estão relacionadas com a função hepática crônica (VARGUESE, J.; JACOB, M. & MURRAY, 2012).

A creatinina é sintetizada a partir da creatina, no fígado, rins e pâncreas. Seu aumento na concentração plasmática é considerado como deterioro da função renal (JAMB; JHONES, 2018; VARGUESE; JACOB & MURRAY, 2012). Dessa maneira, o fornecimento do vinho tinto com e sem álcool, nem a dieta hipercolesterolêmica, não afetaram o teor da creatinina, indicando que não houve alterações nas funções renais. Resultados similares foram registrados no trabalho que avaliaram o efeito de vinho tinto com e sem álcool em ratos hipertensos (MIHAILOVIC-STANOJEVIC et al., 2016).

Em quanto à atividade das enzimas antioxidantes foi observado que após dos 30 dias do fornecimento da dieta hipercolesterolêmica no tecido hepático foi encontrado que os grupos G3 e G6 apresentaram maior atividade da enzima SOD em relação ao G4, indicando que tanto o vinho tinto com e sem álcool, ajudam na redução do radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$ . Não obstante, O G6 apresentou aumento da enzima CAT em comparação com o G3 e G4, o que indica que os compostos fenólicos do vinho tinto contribuem para aumento da enzima CAT favorecendo na redução do  $H_2O_2$  gerado pela atividade da SOD. Embora, os resultados obtidos em relação ao aumento da enzima SOD, foram diferentes ao encontrado na literatura, já que segundo vários estudos o consumo de álcool, reduz a atividade das enzimas SOD e CAT (SHANMUGAM et al., 2011), mas foi similar os resultados obtidos em coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com extrato de semente de uva, extrato de semente e casca de uva que favoreceram no aumento da atividade da CAT no tecido hepático (CHOI et al., 2010).

O fígado é local de síntese e armazenamento dos ácidos graxos e o excesso de lipídios acumulados leva ao aumento do estresse oxidativo por causa da oxidação dos ácidos graxos, gerando esteatose ou fígado graxo e desencadeando aumento da peroxidação lipídica (BOTHAM, K. M.; MAYES, 2012; KIERSZENBAUM A. L., 2012). Neste estudo, todos os grupos avaliados foram fornecidos com dieta hipercolesterolêmica provavelmente influenciou para ter valores similares na

concentração de TBARS, esses resultados foram similares ao reportado pelo Choi et al., (2010) que não encontraram redução da formação de MDA pelo ensaio de TBARS no tecido hepático em coelhos que foram suplementados com extrato de semente de uva, extrato de casca de uva, pó de casca de uva e pó de semente de uva.

Estudos anteriores têm registrado que o consumo do vinho tinto, aumenta as concentrações das enzimas antioxidantes e reduz o MDA (LANDEKA JURČEVIĆ et al., 2017; MACEDO et al., 2013). Em estudo, Chassot et al., (2018) reportou que ratos suplementados com dieta hipercolesterolêmica e vinho tinto com e sem álcool, registraram diminuição da SOD e CAT. O resveratrol, um dos compostos antioxidantes mais abundantes no vinho tinto, ajuda na redução da peroxidação lipídica causada pelo etanol e melhora os níveis das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx (KASDALLAH-GRISSA et al., 2007).

Estudos similares têm reportado que o fornecimento da dieta hipercolesterolêmica contribui no aumento significativo do MDA no fígado como o reportou o trabalho de Mahfouz; Kummerow (2000), além da dieta hipercolesterolêmica provavelmente, o álcool presente no vinho tinto, acelerou ainda mais a produção de EROS na atividade mitocondrial (KASDALLAH-GRISSA et al., 2007; SILVA; FERNANDES; CARVALHO, 2015), elevando a peroxidação lipídica e tendo depleção das enzimas antioxidantes (LANDEKA JURČEVIĆ et al., 2017; MAHFOUZ; KUMMEROW, 2000; SOZAŃSKI et al., 2014; YANNI et al., 2015), não obstante foi evidenciado que a enzima SOD aumentou tanto no grupo fornecido com vinho tinto 13 % (G3) como no grupo do vinho tinto sem álcool (G6).

Os resultados mostraram que o vinho tinto aumentou a atividade da SOD, favorecendo na estabilização do radical superóxido, contribuindo com a redução do estresse oxidativo e, que a pesar de ter aumentado as enzimas antioxidantes endógenas SOD e CAT no G6, de igual maneira o grupo apresentou maior produção de proteínas carboniladas em relação ao G2. Indicando novamente, que provavelmente, os compostos fenólicos e o álcool presente no vinho tinto trabalham juntamente para preservar a homeostase hepática em coelhos hipercolesterolêmicos.

Na avaliação dos parâmetros biométricos não foi encontrada diferença do peso corporal entre os grupos, porém a variação do peso (ganho de peso) foi observada no G3 e G5 em relação ao G4 e G6 que foram os grupos que apresentaram perda de peso ao final do experimento. O aumento de peso dos animais, foram resultados similares a outros estudos que avaliaram o efeito hipercolesterolêmico em coelhos, como relatado por Wang et al. (2005) que também observaram aumento de peso nos coelhos que alimentaram com uma dieta de 1,5 % de colesterol, e também em coelhos alimentados com 0,5 % de colesterol (YANNI et al., 2015). Não obstante a diminuição do peso corporal no G4 e G6 foi similar ao reportado num estudo com ratos que foram alimentados com etanol e resveratrol (AJMO et al., 2008).

O aumento do peso corporal como do fígado pode estar relacionado com a dieta hipercolesterolêmica e o fornecimento do vinho tinto; já que o vinho tinto é considerado uma fonte hipercalórica, que pode interferir nas funções metabólicas (FRENCH et al., 2010; MIHAILOVIC-STANOJEVIC et al., 2016), o que poderia ter influenciado ainda mais no acúmulo de gordura no fígado, sem afetar o número de hepatócitos totais. Papadomichelakis; Zoidis; Fegeros (2012) reportaram que o peso do fígado está relacionado com as mudanças do conteúdo de colesterol e o glicogênio. O G5 apresentou maior tamanho do fígado em relação ao G4, e também o G5 junto com o G6 apresentaram maior densidade em relação ao G1 e G2, indicando que tiveram menor acúmulo de lipídios. Isto provavelmente se deva à proteção exercida pelo vinho tinto com e sem álcool, pois na análise histológica, tanto os grupos fornecidos com vinho tinto com e sem álcool apresentaram menor acúmulo de lipídios no tecido hepático.

Em condições normais, os lóbulos hepáticos são constituídos por cordões de hepatócitos que delimitam com os capilares sinusoides (KIERSZENBAUM A. L., 2012). Em quadro de esteatose, que é acumulação de lipídios (triglicérides) nos hepatócitos, ocorre a perda de organização celular e hepatomegalia (TINIAKOS; ANSTEE; BURT, 2018).

A esteatose é caracterizada pelo acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, principalmente TAG, onde vão se juntando até deslocar o núcleo até a periferia da célula (CABALLERÍA et al., 2012). No trabalho, houve presença de macrófagos e infiltrado inflamatório em todos os grupos avaliados; a presença

deles é indicativo de danos nos hepatócitos ocasionado pelo aumento de lipídios no tecido hepático (CABALLERÍA et al., 2012).

A porcentagem de lipídios no fígado normal é de 5 % aproximadamente (TINIAKOS; ANSTEE; BURT, 2018); neste trabalho, a dieta hipercolesterolêmica, desenvolveu esteatoses em todos grupos, pois o acúmulo de lipídios foi maior. A dieta hipercolesterolêmica, levou ao acúmulo de lipídios em todos os grupos, destacando-se que o G1, foi o que mais acumulou, mostrando uma desorganização celular; aumento do volume citoplasmático e celular. Também foi observado presença de capilares sinusoides, degeneração celular e infiltrado inflamatório. O acúmulo de lipídios causado pela dieta hipercolesterolêmica é similar ao reportado por outros autores (Da COSTA GUERRA et al., 2015; YANNI et al., 2015).

No grupo que recebeu a dosagem da sinvastatina, onde se esperava diminuição de lipídios e proteção celular, observou-se notável acúmulo de lipídios quando comparado com os grupos fornecidos com vinho tinto com e sem álcool; presença de infiltrado inflamatório, colágeno e desorganização estrutural dos hepatócitos também foi observado.

Os dados obtidos mostram que os grupos que receberam o vinho tinto com e sem álcool apresentaram menos acúmulo de lipídios nos hepatócitos mostrando melhor organização tecidual, quando comparados com o G1 e G2. O acúmulo foi evidenciado em microvesículas e macrovesículas de lipídios, sendo característico da esteatose microvesicular (CABALLERÍA et al., 2012). Também foi observado nesses grupos regiões com infiltrado inflamatório, causado não só pela dieta hipercolesterolêmica, mas também pelo álcool administrado. Tal fato pode acontecer pois o consumo de álcool provoca oxidação dos ácidos graxos e maior produção de EROS (CABALLERÍA et al., 2012), sendo um fator para o desenvolvimento de doenças hepáticas. Por outro lado, as antocianinas presentes no vinho tinto ajudaram na proteção dos hepatócitos. Outro fator que também poderia estar acontecendo é que tanto os compostos fenólicos como o álcool ajudam na proteção hepática, pois o vinho tinto sem álcool apresentou acúmulo de lipídios similares aos demais grupos fornecidos com o vinho tinto.

Com relação ao tamanho dos hepatócitos, o G4 apresentou menor tamanho e volume nuclear, citoplasmático e celular, o qual pode estar relacionado com o menor tamanho do fígado, quando comparado com o G1. Além disso o G5 e G6

apresentaram valores similares desses parâmetros comparados com o G1, sugerindo que apesar de apresentar efeito protetor no tecido hepático, provavelmente os hepatócitos poderiam ter sofrido degeneração celular (apoptose ou necrose). Confirmando que os benefícios do vinho tinto são devido à ação conjunta do álcool e os compostos fenólicos.

O grau de esteatose hepática, foi significativamente inferior no G2, G3, G4, G5 e G6, quando comparados com o G1 que apresentou grau 2 de esteatose. Os animais suplementados com o vinho tinto com e sem álcool esse índice foi  $\leq 2$ , indicando que o acúmulo de lipídios nos hepatócitos foi inferior a 50 %. Confirmando que tanto a presença ou ausência de álcool no vinho tinto, apresentam capacidade hepatoprotetora, sendo também mais eficiente que o medicamento sinvastatina em diminuir os depósitos de lipídios no fígado de coelhos.

Estudos similares têm reportado que o consumo de compostos fenólicos ajuda na redução do acúmulo de lipídios no fígado, como o evidenciado pelo (Da COSTA GUERRA et al., 2015) os autores observaram que o extrato aquoso de açaí diminuiu os depósitos de lipídios no tecido hepático de ratos hipercolesterolêmicos. O consumo de suco de manga Ubá também apresentou redução do desenvolvimento da doença esteatose em ratos alimentados com ração hipercolesterolêmica (NATAL et al., 2017). Rosenzweig et al., (2017) Encontraram que o tempo de maceração não afetou as propriedades do vinho e encontrou que o vinho com diferentes tempos de maceração melhora a esteatose hepática, a tolerância a glicose e a sensibilidade a insulina.

Este é o primeiro trabalho em que se avalia o efeito das dosagens de álcool no vinho tinto e vinho tinto sem álcool na prevenção da doença hepática gordurosa. Os resultados exibidos demonstram que tanto o vinho tinto com e sem álcool, ajuda na prevenção do desenvolvimento da esteatose provocada pelo fornecimento de uma dieta rica em colesterol, obtendo melhores resultados que o uso de sinvastatina, portanto, o consumo de uma taça de vinho tinto Cabernet Sauvignon (150 mL) pode ser alternativa para reduzir o risco de desenvolver esteatose hepática.

## 5. Conclusões

O consumo de vinho tinto não alterou os parâmetros sanguíneos do colesterol e os marcadores hepáticos. Embora não houve alterações na inibição da peroxidação lipídica, o vinho tinto com e sem álcool aumentaram as enzimas antioxidantes SOD e CAT, no entanto, o vinho tinto sem álcool não foi eficiente na redução da oxidação pela proteína carbonilada.

O consumo diário de vinho tinto com e sem álcool foi capaz de reduzir o acúmulo de lipídios no tecido hepático, especialmente nas porcentagens de álcool de 13 % e 8 %, e obtendo melhores resultados do que a sinvastatina.

## 6. Referências bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126, 1984.
- AJMO, J. M., LIANG, X., ROGERS, C. Q., PENNOCK, B., & YOU, M. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(4), G833-G842, 2008.
- ALISSA, E. M.; FERNS, G. A. Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1950–1962, 2017.
- APOSTOLIDOU, C.; ADAMOPOULOS, K.; LYMPERAKI, E.; ILIADIS, S.; PAPAPREPONIS, P. & KOURTIDOU-PAPADELI, C. Cardiovascular risk and benefits from antioxidant dietary intervention with red wine in asymptomatic hypercholesterolemics. *Clinical nutrition ESPEN*, 10(6), e224-e233, 2015.
- ARAÚJO, L. M. B.; LIMA, D. S.; DALTRO, C. Associação da gama-glutamyl transferase e a síndrome metabólica em mulheres obesas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 49(4), 557–562, ago. 2005.
- BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Transporte y almacenamiento de lípidos. In: Harper 's Illustrated Biochemistry. 29. ed. Mexico D.F.: McGraw Hill, 2012. p. 238–245.
- CABALLERÍA, J.; ALTAMIRANO, J.; MICHELENA, J.; & PARÉS, A. Enfermedad hepática inducida por el alcohol. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(10), 581-589, 2012.
- ÇAYLI, M. et al. Gamma glutamyl transferase activity. *Herz*, 39(6), 761–766, 2014.
- CHASSOT, L. N.; SCOLARO, B.; ROSCHEL, G. G.; COGLIATI, B.; CAVALCANTI, M. F.; ABDALLA, D. S. & CASTRO, I. A. Comparison between red wine and isolated trans-resveratrol on the prevention and

regression of atherosclerosis in LDLr (-/-) mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 61, 48-55, 2018.

CHOI, U.K.; LEE, O.H.; YIM, J.H.; CHO, C.W.; RHEE, Y.K.; LIM, S.I. & KIM, Y.C. Hypolipidemic and antioxidant effects of dandelion (*taraxacum officinale*) root and leaf on cholesterol-fed rabbits. *International journal of molecular sciences*, 11(1), 67-78,2010.

CUPERTINO, M. C., COSTA, K. L. C., SANTOS, D. C. M., NOVAES, R. D., CONDESSA, S. S., NEVES, A. C., OLIVEIRA, J. A., MATTA, S. L. P. Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 94(5), 343–351, 2013.

DA COSTA GUERRA, J. F. et al. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice. *Journal of Functional Foods*, 14, 192-202, 2015.

DASGUPTA, A. Liver Enzymes as Alcohol Biomarkers. *Alcohol and its Biomarkers*, p. 121–137, 2015.

DI CASTELNUOVO, A.; ROTONDO, S.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M. B.; & DE GAETANO, G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*, 105(24), 2836–2844, 2002.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>>.

FRENCH, M. T., NORTON, E. C., FANG, H. A. I., & MACLEAN, J. C. Alcohol consumption and body weight. *Health economics*, 19(7), 814-832, 2010.

HABIG, W. H.; PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. the *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139, 1974.

HANSEN, A. S.; MARCKMANN, P.; DRAGSTED, L.O.; NIELSEN, I.L.F.; NIELSEN, S.E. & GRØNBÆK, M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(3), 449–455, 2005.

IBÁÑEZ SAMANIEGO, L.; DÍAZ RUÍZ, R. Protocolo diagnóstico de la colestasis intrahepática. *Medicine (Spain)*, 12(11), 635–639, 2016.

ICHIKAWA, T.; KITAJIMA, S.; LIANG, J.; KOIKE, T.; WANG, X.; SUN, H.; OKAZAKI, M.; MORIMOTO, M.; SHIKAMA, H.; WATANABE, T. & YAMADA, N. Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits leads to increased small dense LDL in plasma and promotes atherosclerosis. *Laboratory Investigation*, 84(6), 715–726, 3 jun. 2004.

JAMB, E. J.; JHONES, G. R. D. Kidney functions test. In: T., R. N. H. A. R. . W. C. (Ed.). TIETZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY and MOLECULAR DIAGNOSTICS. 6. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc., 2018. p. 490–491.

JANSEN, H.; VERHOEVEN, A. J. M. & SIJBRANDS, E. J. G. Hepatic lipase. *Journal of Lipid Research*, 43(9), 1352–1362, set. 2002.

KASDALLAH-GRISSA, A.; MORNAGUI, B.; AOUANI, E.; HAMMAMI, M.; EL MAY, M.; GHARBI, N.; KAMOUN, A. & EL-FAZAÂ, S. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life sciences*, 80(11), 1033-1039, 2007.

KIERSZENBAUM A. L. Glândulas digestórias. In: KIERSZENBAUM A. L. (Ed.). *Histologia e Biologia celular, uma introdução à patologia*. 3. ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2012. p. 514–515.

LANDEKA JURČEVIĆ, I.; DORA, M.; GUBEROVIĆ, I.; PETRAS, M.; RIMAC BRNČIĆ, S., & ĐIKIĆ, D. Polyphenols from Wine Lees as a Novel Functional Bioactive Compound in the Protection Against Oxidative Stress and Hyperlipidaemia. *Food technology and biotechnology*, 55(1), 109–116, 2017.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S. & STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186, 464–478, 1990.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–75, nov. 1951.

MACEDO, L. F. L., ROGERO, M. M., GUIMARÃES, J. P., GRANATO, D., LOBATO, L. P., & CASTRO, I. A. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food chemistry*, 137(1-4), 122-129, 2013.

MADESH, M. & BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 35(3), 84–188, 1998.

MAHFOUZ, M. M.; KUMMEROW, F. A. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(5), 293–302, 2000.

MASON, J. E.; STARKE, R. D.; VAN KIRK, J. E. Gamma-glutamyl transferase: A novel cardiovascular risk biomarker. *Preventive Cardiology*, 13(1), 36–41, 2010.

MIHAILOVIC-STANOJEVIC, N.; SAVIKIN, K., ZIVKOVIC, J., ZDUNIC, G., MILORADOVIC, Z., IVANOV, M., KARANOVIC, D., VAJIC, U.J., JOVOVIC, D. & GRUJIC-MILANOVIC, J. Moderate consumption of alcohol-free red wine provide more beneficial effects on systemic haemodynamics, lipid profile and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats than red wine. *Journal of Functional Foods*, 26, 719–730, 2016.

NATAL, D. I. G. et al. Bioactive compounds of the Ubá mango juices decrease inflammation and hepatic steatosis in obese Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, 32, 409–418, 2017.

NOGUER, M. A.; CEREZO, A. B.; NAVARRO, E. D. & GARCIA-PARRILLA, M. C. Intake of alcohol-free red wine modulates antioxidant

- enzyme activities in a human intervention study. *Pharmacological Research*, 65(6), 609–614, 2012.
- NOVAES, R. D., GONÇALVES, R. V., MARQUES, D. C. S., CUPERTINO, M. DO C., PELUZIO, M. DO C. G., LEITE, J. P. V., & MALDONADO, I. R. DOS S. C. Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicologic Pathology*, 40(1), 62–70, 2012.
- PAPADOMICHELAKIS, G.; ZOIDIS, E.; FEGEROS, K. Dietarily induced changes in liver composition and weight of fattening rabbits. *Livestock Science*, 144(1-2), 190–196, 2012.
- PATHEGUINI, M. & BAIS, R. Serum Enzymes. In: RIFAI, NADER; HORVATH, ANDREA R.; WITTEWER, C. (Ed.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. sixth edit ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018. p. 404–424.
- ROSENZWEIG, T. et al. Red wine and wine pomace reduced the development of insulin resistance and liver steatosis in HFD-fed mice. *Journal of Functional Foods*, 34, 379–389, 2017.
- SHANMUGAM, K. R., MALLIKARJUNA, K., & REDDY, K. S. Effect of alcohol on blood glucose and antioxidant enzymes in the liver and kidney of diabetic rats. *Indian journal of pharmacology*, 43(3), 330, 2011.
- SILVA, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F. Dual effect of red wine on liver redox status: a concise and mechanistic review. *Archives of Toxicology*, 89(10), 1681–1693, 2015.
- SOZAŃSKI, T. et al. The protective effect of the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry) on hypertriglyceridemia and atherosclerosis through PPAR $\alpha$  activation in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*, 21(13), 1774–1784, 2014.
- TARGHER, G. Elevated serum  $\gamma$ -glutamyltransferase activity is associated with increased risk of mortality, incident type 2 diabetes, cardiovascular events, chronic kidney disease and cancer - A narrative review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(2), 147–157, 2010.
- THOMPSON, P. D.; PANZA, G., ZALESKI, A. & TAYLOR, B. Statin-associated side effects. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(20), 2395–2410, 2016.
- TINIAKOS, D. G.; ANSTEE, Q. M.; BURT, A. D. Fatty Liver Disease. In: *Macsween's Pathology of the Liver*. Seventh Ed ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 308–371.
- TURLIN, B., RAMM, G. A., PURDIE, D. M., LAINÉ, F., PERRIN, M., DEUGNIER, Y., & MACDONALD, G. A. Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. *Liver International*, 29(4), 530–535, 2009.
- VARGUESE, J.; JACOB, M. & MURRAY, R. K. Bioquímica clínica. In: *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29. ed. Mexico D.F.: McGraw Hill, 2012. p. 721–722.

WALLIN, B.; ROSENGREN, B., SHERTZER, H. G., & CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*, 208(1), 10-15, 1993.

WANG, Z., HUANG, Y., ZOU, J., CAO, K.; XU, Y., WU, J. M. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 9(1), 77-79, 2002.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase. *Critical reviews in clinical laboratory science*. 38(4), 263-355, 2001.

YANNI, A. E., EFTHYMIU, V., LELOVAS, P., AGROGIANNIS, G., KOSTOMITSOPOULOS, N., & KARATHANOS, V. T. Effects of dietary Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) on atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits. *Food & Function*, 6(3), 963-971, 2015.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

O consumo moderado de vinho tinto com e sem álcool durante 30 dias em coelhos hipercolesterolêmicos não alterou os níveis no plasma sanguíneo de Ct, HDL-C, LDL, TG. Mas foi encontrado que o consumo de vinho tinto aumentou a atividade da enzima antioxidante GST no tecido aórtico reduzindo o desenvolvimento da placa de ateroma, além disso, o vinho tinto 13 % como o vinho tinto sem álcool favoreceram no aumento das enzimas antioxidantes SOD e CAT reduzindo o dano hepático.

Foi evidenciado que o vinho tinto mesmo sem álcool foi capaz de diminuir o acúmulo de lipídios no fígado, evitando a progressão da esteatose e da placa de ateroma. Apesar da sinvastatina ter reduzido a formação da placa de ateroma, houve grande quantidade de lipídios acumulados no tecido hepático, o que pode levar ao desenvolvimento da hepatotoxicidade. Portanto, nos coelhos hipercolesterolêmicos o vinho tinto pode ser utilizado como uma bebida alternativa para reduzir o risco de desenvolver esteatose hepática e evitar a formação da placa de ateroma.