



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**Efeito do extrato de folhas de videira orgânica, da variedade Bordô
(*Vitis labrusca*, L.) sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em
ratos diabéticos**

Aluno

Denise dos Santos Lacerda

Orientadora

Prof. Dra. Rosane Gomez

Co-orientadora

Prof. Dra. Claudia da Silva Funchal, IPA

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfsio

Rua Sarmiento Leite, número 500, 2º andar

90050-170 – Porto Alegre – RS - Brasil

**Efeito do extrato de folhas de videira orgânica, da variedade Bordô
(*Vitis labrusca*, L.) sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em
ratos diabéticos**

DENISE DOS SANTOS LACERDA

Orientadora: Dra. Rosane Gomez

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Fevereiro de 2014

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski
Departamento de Fisiologia
ICBS - UFRGS

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo
Departamento de Fisiologia
ICBS - UFRGS

Prof. Dra. Caroline Dani
Centro Universitário Metodista do IPA

Agradecimentos

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades.

Ao meu esposo, Arlindo Antônio Pinós, e aos meus filhos Wesley Lacerda Pinós e Andriw Lacerda Pinós, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por compreenderem os momentos de ausência necessários à minha formação.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos e cunhados pelo amor e incentivo.

À minha orientadora, Dra. Rosane Gomez, pela oportunidade, confiança, atenção e principalmente por compartilhar seus ensinamentos e experiências ao longo desta dissertação.

À minha co-orientadora, Dra. Cláudia Funchal, pela amizade e por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS.

Aos alunos de Iniciação Científica que foram fundamentais para a realização do presente trabalho.

Aos queridos amigos, pelo carinho e inesgotáveis palavras de incentivo.

Sumário

Lista de Figuras e Tabelas	7
Lista de Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	13
Referencial teórico	
1.1 Diabete	15
1.2 Fisiopatologia do diabete: alterações metabólicas	16
1.3 Fisiopatologia do diabete: alterações moleculares	18
1.4 Fisiopatologia do diabete: estresse oxidativo	21
1.5 Uva e fitoquímicos bioativos	26
1.6 Farmacologia dos compostos fenólicos	28
Objetivos	
2.1 Geral	32
2.2 Específicos	32
Materiais e métodos	
3.1 Animais	35
3.2 Indução do diabete	35
3.3 Extrato de folha de videira orgânica	36
3.3.1 Identificação botânica	36
3.3.2 Otenção do extrato bruto	36
3.4 Procedimento experimental	37
3.5 Monitorização do consumo de ração e água	38
3.6 Avaliação de medidas ponderais	38
3.7 Determinação de parâmetros bioquímicos	39
3.7.1 Teste oral de tolerância à glicose	39
3.8 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo	40
3.8.1 Preparo do homogeneizado	40
3.8.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	40
3.8.3 Grupamentos tiois totais (sulfidrilas totais)	41
3.8.4 Proteínas modificadas oxidativamente (carbonilas protéicas)	41
3.8.5 Atividade da enzima catalase (CAT)	41
3.8.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	42

3.9 Dosagem de proteínas	42
3.10 Compostos fenólicos do extrato de folha de videira orgânica	42
3.11 Análise estatística	43
Resultados	
4.1 Conteúdo total de polifenóis	43
4.2 Estimativa do consumo de ração, água e índice de eficiência alimentar	44
4.3 Avaliação de medidas ponderais	46
4.4 Peso relativo dos tecidos	48
4.5 Glicemia de jejum e após sobrecarga de glicose	49
4.6 Parâmetros séricos: Lipídicos, hepáticos e renais	51
4.7 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo	52
4.7.1 Fígado	52
4.7.2 Coração	57
4.7.1 Rim	61
Discussão	
5.1 Composição do aquoso de folha de videira orgânica	65
5.2 Parâmetros metabólicos	67
5.2.1 Efeito do extrato de folha de videira orgânica sobre a glicemia	67
5.2.2 Efeito do extrato de folha de videira orgânica sobre lipídeos	68
5.2.3 Efeito do extrato de folha de videira orgânica sobre função hepática e renal	70
5.2.4 Efeito do extrato de folha de videira orgânica sobre parâmetros oxidativos	73
no fígado	
5.2.4 Efeito do extrato de folha de videira orgânica sobre parâmetros oxidativos	76
no coração	
5.2.4 Efeito do extrato de folha de videira orgânica sobre parâmetros oxidativos	79
no rim	
6. Considerações finais	81
7. Perspectivas	82
8. Referências	84
9. Anexo I: Aprovação CEUA/UFRGS	101

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1.	Unificação dos mecanismos intracelulares causadores de dano no diabetes	19
Figura 2.	Estrutura básica (A) e classificação (B) dos polifenóis	28
Figura 3.	Estimativa de glicose capilar nos animais; A: aparelho para determinação da glicemia; B: coleta de sangue	35
Figura 4.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o consumo semanal de ração (g/rato/semana) nos ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	43
Figura 5.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o consumo semanal de água (mL/rato/semana) nos ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	
Figura 6.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a eficiência alimentar em ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	44
Figura 7.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o peso semanal em ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	45
Figura 8.	Efeito da administração crônica do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o teste oral de tolerância a glicose (TOTG) em ratos diabéticos (A) e não diabéticos (B)	46
Figura 9.	Efeito da administração crônica do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	49
Figura 10.	Efeito do tratamento crônico com extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a concentração de carbonilas proteicas	52
Figura 11.	Efeito do tratamento crônico com extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a concentração de sulfidrilas totais no fígado de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	53
Figura 12.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) (A) e da catalase (CAT) (B) no fígado de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	54
Figura 13.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no coração de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	55
Figura 14.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as carbonilas proteicas no coração de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias.	56
Figura 15.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as sulfidrilas totais no coração de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	57
Figura 16.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de	57

	50, 100 ou 200mg/kg, sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no coração de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	
Figura 17.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200 mg/kg, sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no rim de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	58
Figura 18.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as carbonilas proteicas no rim de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	59
Figura 19.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as sulfidrilas totais no rim de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	59
Figura 20.	Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no rim de ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias	60
Tabela 1	Conteúdo total fenólico do extrato aquoso de folha de videira orgânica	43
Tabela 2	Varição de peso total, percentual e índice de Lee em ratos diabéticos e não diabéticos após 30 dias de administração do extrato da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg	47
Tabela 3	Peso relativo (g de tecido/100g de peso corporal) de diferentes tecidos de ratos diabéticos e não diabéticos após 30 dias de administração do extrato aquoso da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg	48
Tabela 4	Concentração de lipídeos e lipoproteínas séricas em ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) após 30 dias de administração do extrato da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg	50
Tabela 5	Perfil de função hepática e renal em ratos diabéticos e não diabéticos após 30 dias de administração do extrato da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg	51

Lista de abreviaturas

Acetil-CoA: acetil Coenzima A

AGEs: produtos avançados de glicação não-enzimática

AGLs: ácidos graxos totais

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

CAT: catalase

Cu/Zn-SOD: superóxido dismutase com cobre/zinco

DM: *Diabetes mellitus*

DM1: *Diabetes mellitus* Tipo 1

DM2: *Diabetes mellitus* Tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

ERN: espécies reativas de nitrogênio

FADH₂: flavina-adenina dinucleotídeo

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPx: glutatona peroxidase

GSH: glutatona reduzida

GSSG: dissulfeto de glutatona

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HDL: lipoproteína de alta densidade

HO[•]: radical hidroxil

IFOAM: Federation of Organic Moviments

LDL: lipoproteína de baixa densidade

Mn-SOD: superóxido dismutase com manganês

NAD(P)H- oxidase: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase

NADH: nicotinamina adenina dinucleotídeo

NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

[•]NO: óxido nítrico

O₂: oxigênio molecular

O₂^{•-}: ânion radical superóxido

OH: hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

PARP: poli ADP-ribose polimerase

PKC: proteína cinase C

RAGE: receptor de produtos avançados de glicação não-enzimática

ROOH: hidroperóxidos orgânicos

ROS: espécies reativas de oxigênio

-SH: grupamento tiol

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

Resumo

Diabetes mellitus é uma doença caracterizada por hiperglicemia crônica, resultando em desequilíbrio metabólico e estresse oxidativo e promovendo dano tecidual. Fitoquímicos bioativos, como os polifenóis presentes na uva e seus subprodutos, especialmente quando cultivada sem agrotóxicos, representam alternativa terapêutica para prevenção das alterações metabólicas e oxidativas em indivíduos diabéticos. Portanto, nosso objetivo foi avaliar o efeito de extrato aquoso de folhas de videira, da variedade Bordô (*Vitis labrusca*), produzida por cultivo orgânico, sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em ratos diabéticos. Foram utilizados ratos Wistar, machos (n = 88), pesando cerca de 300 g, randomicamente divididos em grupos de não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ), sendo o diabetes induzido pela administração única de 60 mg/kg de estreptozotocina via intraperitoneal. Os animais receberam doses diárias de salina (grupos: CTR0 e STZ0) ou extrato aquoso da folha da videira orgânica, nas concentrações de 50 mg/kg (grupos: CTR50 e STZ50), 100 mg/kg (grupos: CTR100 e STZ100) ou 200 mg/kg (grupos: CTR200 e STZ200) administrados via gavagem, por 30 dias. No 30º dia, após 30 minutos da última administração, os animais foram decapitados e o sangue troncular coletado para a determinação da glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total e frações, bem como ureia, creatinina e transaminases (AST e ALT). A resposta metabólica pelo uso do extrato foi avaliada pelo teste oral de tolerância à glicose (28º dia) e variações no consumo alimentar, hídrico e ganho de peso. Os tecidos cardíaco, renal e hepático foram dissecados e homogeneizados para avaliação da lipoperoxidação (TBARS) e da oxidação proteica (quantificação carbonilas), bem como para determinação das concentrações de antioxidantes não enzimáticos (sulfidrilas totais) e da atividade de antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Nossos resultados mostraram que o diabetes aumentou a ingestão hídrica e alimentar, bem como reduziu os depósitos de gordura corporal e o peso corporal. Adicionalmente, o diabetes aumentou parâmetros séricos como, glicose,

triglicerídeos, HDL-C, ureia, AST e ALT. A administração do extrato, na dose de 200 mg/kg, preveniu a perda de gordura epididimal e a redução de peso corporal nos animais diabéticos. Na dose de 50 mg/kg, o extrato reduziu a concentração sérica de LDL-C, ureia e creatinina nos ratos diabéticos. As doses de 50 e 100 mg/kg do extrato preveniram o aumento na atividade da AST. Em relação aos parâmetros oxidativos, o diabetes promoveu lipoperoxidação, evidenciado pelo aumento de TBARS no fígado e no coração. A administração do extrato de folha de videira, nas três diferentes doses, reduziu a concentração de TBARS no fígado dos ratos diabéticos. Ainda, o diabetes aumentou a concentração de carbonilas, e reduziu os níveis de sulfidrilas totais em todos os tecidos avaliados. Para a oxidação de proteínas, observamos que a administração do extrato, em todas as doses testadas, reduziu a concentração de carbonilas no coração e rins dos ratos diabéticos. No fígado, essa redução ocorreu apenas para as doses de 100 e 200 mg/kg. Houve aumento das defesas antioxidantes não enzimáticas (sulfidrilas totais) no fígado dos ratos diabéticos após administração de qualquer dose de extrato. No entanto, esse aumento foi observado no coração apenas nas doses de 100 e 200 mg/kg e no rim apenas na dose de 50 mg/kg. O diabetes aumentou a CAT no fígado e no coração e a SOD no rim de ratos, enquanto que o extrato reduziu a atividade da CAT no fígado na dose de 50 mg/kg e no coração, na dose de 100 mg/kg. No entanto, o extrato reduziu a atividade da SOD no rim de ratos diabéticos apenas na dose de 50 mg/kg. Com base nos nossos resultados podemos concluir que a administração do extrato aquoso de folha de videira orgânica possui potencial terapêutico nos animais diabéticos, evidenciado pela proteção contra perda de peso e do depósito de tecido adiposo, bem como efeito hipocolesterolêmico, hepatoprotetor, cardioprotetor, nefroprotetor e antioxidante.

Abstract

Diabetes mellitus is a disease characterized by chronic hyperglycemia, resulting in metabolic imbalance, and oxidative stress, promoting tissue damage. Bioactive phytochemicals, such as polyphenols, present in grapes and their sub-products, especially when they are cultivated without pesticides, represent a therapeutic alternative for preventing metabolic and oxidative damage in diabetic individuals. Therefore, our objective was to evaluate the effect of aqueous extract of vine leaves, from the Bordô varietal (*Vitis labrusca*), produced by organic culture method, on metabolic parameters and oxidative stress in diabetic rats. Male Wistar rats (n=88), weighting around 300 g, were randomized in non-diabetic (CTR) and diabetic (STZ) groups, with diabetes induced by streptozotocin, 60 mg/kg, via intraperitoneal. The rats were given daily doses of saline (CTR0 and STZ0 groups) or organic vine leaves aqueous extract at concentrations of 50 mg/kg (CTR50 and STZ50 groups), 100 mg/kg (STZ100 and CTR100 groups), or 200 mg/kg (STZ200 and CTR200 groups), by oral gavage, for 30 days. On the 30th day, 30 min from the last administration, rats were decapitated and trunk blood was collected to determine fasting glycemia, triglycerides, total and fractions cholesterol, as well as urea, creatinine, and transaminases (AST and ALT). The effect of the organic vine leaves aqueous extract on metabolic response in rats was evaluated by oral glucose tolerance test (28th day) and intake of food, water and weight gain. Heart, liver and kidney were dissected and homogenized to evaluate the lipid peroxidation (TBARS) and protein oxidation (carbonyl quantification), as well as the concentration of non-enzymatic antioxidants (free sulfhydryl) and the concentration of enzymatic antioxidants, such as superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) enzymes activity. Our results showed that diabetes increased water and food intake, and reduced body fat deposits, and body weight in rats. Additionally, diabetes increased serum glycemia, triglycerides, HDL-C, urea, and transaminases. The administration of the extract at dose of 200 mg/kg, prevented the loss of epididymal fat and body weight reduction in diabetic animals. At a dose of

50 mg/kg, the extract reduced the serum concentration of LDL-C, urea, and creatinine in diabetic animals. The doses of 50 and 100 mg/kg of the extract prevented the increase in the AST activity in diabetic rats. As to oxidative parameters, diabetes promoted lipid peroxidation, as evidenced by the increase in TBARS in liver and heart. The administration of the extract of vine leaf, in three different doses, reduced the concentration of TBARS in the liver of diabetic rats. Also, diabetes increased the concentration of carbonyl but reduced levels of free sulfhydryl in all the tissues analyzed. For the oxidation of proteins, it was observed that the administration of the extract at all doses tested reduced the concentration of carbonyls in the heart and kidney of diabetic rats. In the liver, this reduction was observed only for doses of 100 and 200 mg/kg. There was increase non-enzymatic antioxidant defenses (sulfhydryl) in the liver of diabetic rats after administration of any doses of extract. However, this increase was observed in the heart only at doses of 100 and 200 mg/kg and in the kidney, only at doses of 50 mg/kg. Diabetes increased the CAT in the liver and in the heart and it increased the SOD in the kidney of rats. The extract reduced CAT activity in the liver at a dose of 50 mg/kg and in the heart, at a dose of 100 mg/kg. However, the extract reduced SOD activity in the kidney of diabetic rats only at a dose of 50 mg/kg. Based on our results we concluded that the administration of aqueous leaves extract of organic vine presents therapeutic potential in diabetic individuals, as evidenced by protection against weight loss and deposit of adipose tissue, as well as hypocholesterolemic, hepatoprotective, cardioprotective, nephroprotective and antioxidant effects.

Referencial Teórico

1.1 Diabete

O *Diabetes mellitus* (DM) pode ser definido como um desequilíbrio metabólico crônico, de origem multifatorial, caracterizado por um estado de hiperglicemia crônica, causado por deficiência na secreção e/ou ação da insulina, o principal regulador da homeostase glicêmica (WHO 2013).

Basicamente, o DM pode ser classificado em Tipo 1 (DM1) e Tipo 2 (DM2) (SBD, 2013). O DM1 é uma doença-órgão específica, associado a fatores imunogenéticos e ambientais resultado da destruição das células beta-pancreáticas produtoras de insulina (Liu e Eisenbarth, 2002). O DM 2, é caracterizado por resistência tecidual à ação da insulina, influenciada por pré-disposição genética e fatores ambientais, como ingestão de dieta desequilibrada, sedentarismo e obesidade (Gupte *et al.*, 2009; Leahy, 2005). A resistência periférica à insulina também afeta o metabolismo de lipídeos, resultando em aumento na concentração plasmática de ácidos graxos totais, tendo ação direta sobre a transdução do sinal da insulina muscular e hepática, diminuindo a incorporação de glicose pelo músculo esquelético, e aumentando a gliconeogênese e o fornecimento de glicose do fígado para a circulação (Li *et al.*, 2010; Cusi, 2009). O diabete se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, hiperfagia e, no caso do DM1, perda de peso, cetoacidose diabética e estado hiperosmolar hiperglicêmico (WHO 2013; ADA 2011).

Segundo dados da Federação Internacional do Diabetes (IDF, 2013), mais de 8% da população mundial é diabética, representando aproximadamente 380 milhões de pessoas. Esta alta prevalência exigiu um investimento de US\$ 548 milhões para o tratamento da doença, equivalente a 11% das despesas totais em saúde (IDF, 2013). Nas regiões sul e central do continente americano, um em cada 11 adultos tem diabete. No Brasil mais de 10% dos adultos possuem diagnóstico clínico de DM, com estimativa de aumentar para cerca 20% de doentes até 2030 (IDF 2013).

Em diabéticos, as altas taxas de morbidade e mortalidade estão relacionadas às complicações microvasculares ou macrovasculares (Daneman 2006, Narayan 2003). Complicações microvasculares incluem a retinopatia, a neuropatia e a nefropatia enquanto que as complicações macrovasculares estão relacionadas à aterosclerose e doenças cardiovasculares (Nathan 1993). Em 2011, 4,8 milhões de pessoas morreram devido ao diabetes (IDF 2013).

1.2 Fisiopatologia do diabete: alterações metabólicas

A insulina é o mais importante regulador do metabolismo energético, participando de vias de sinalização anabólicas (Devlin 2007). Anormalidades metabólicas no diabete resultam da deficiência de insulina, e da ação do glucagon ou adrenalina, hormônios contra-insulínicos que alteram expressivamente o metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos (Devlin 2007; IDF 2013). A hiperglicemia é causada pela hiperprodução de glicose hepática por vias gliconeogênicas, associada a uma deficiência na utilização periférica (Devlin 2007; IDF 2013). Em consequência do incremento de glicose plasmática, ocorre um aumento na tonicidade do líquido extracelular gerando desidratação em nível celular, que pode ser compensada pelo aumento da ingesta hídrica (polidipsia) (Kahn *et al.*, 2009).

Em níveis fisiológicos, a glicose é filtrada pelos glomérulos e quase totalmente reabsorvida pelos túbulos renais. Entretanto, quando a glicose plasmática é superior a 180 mg/dL, ultrapassa o limiar renal de filtração de glicose e eliminada na urina, com o aparecimento de glicosúria (Mota 2003). Conseqüentemente, a glicosúria aumenta o volume urinário excretado (poliúria) e a osmolaridade urinária, levando ao aumento da excreção de água e eletrólitos, como cloreto, sódio e potássio, processo denominado diurese osmótica (Bailey 2011). Além de reduzir a volemia e causar desidratação, a diurese osmótica acarreta alterações nos túbulos

contorcidos proximais renais, bem como lesão glomerular com conseqüente prejuízo na filtração (Bailey 2011).

A redução do efeito da insulina no tecido adiposo estimula a lipólise, favorecendo o aumento de ácidos graxos totais (AGLs). Os AGLs podem ser direcionados ao fígado para a β -oxidação e produção de acetil Coenzima A (Acetil-CoA) que é substrato para a cetogênese, uma via hepática de produção de corpos cetônicos. Quando a produção de corpos cetônicos é intensa, haverá uma redução do pH sanguíneo, caracterizando a cetoacidose diabética, uma complicação aguda e potencialmente fatal (Devlin 2007; Kahn *et al.*, 2009).

O excesso de AGLs no fígado também estimula uma maior produção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Anormalidades lipídicas em diabéticos, como aumentos séricos de triglicerídeos, colesterol LDL (LDL-C) e uma redução no colesterol HDL (HDL-C) caracterizam a dislipidemia, sendo esta condição um importante fator de risco para a aterosclerose e complicações cardiovasculares (Glesner *et al.*, 2009; Dhingra, Ramachandran 2012). Estudos mostram que a dislipidemia também está associada à lesão renal em diabéticos (Sun *et al.*, 2002; Kahn *et al.*, 2009). Ratos com colesterol plasmático elevado apresentam uma importante redução na função renal e alto grau de lesão glomerular (Kasiske *et al.*, 1990).

Sabe-se que o *turnover* das proteínas também pode ser afetado pelo diabete, sendo o grau de comprometimento influenciado pelo grau de deficiência de insulina, disponibilidade de aminoácidos e nível de controle glicêmico (Kahn *et al.*, 2009; Kimball *et al.*, 1994). A hipoinsulinemia diminui a síntese proteica em todos os tecidos, induz ao balanço nitrogenado negativo, aumenta a atividade proteolítica muscular e o transporte de aminoácidos para o fígado, para a produção de glicose pela gliconeogênese (Devlin 2007).

Em diabéticos, a redução da sinalização insulínica induz a polifagia, por elevar a atividade neuronal do núcleo arqueado do hipotálamo, estimulando neuropeptídeos responsáveis pelo consumo alimentar (Asakawa *et al.*, 2007). Embora apresentem polifagia, estes indivíduos

manifestam uma acentuada redução de peso corporal, devido a uma redução nos depósitos de gordura corporal e aumento da lise proteica (Kahn *et al.*,2009).

De fato, as complicações em longo prazo no diabetes parecem ser proporcionais ao descontrole metabólico, sendo a deficiência de insulina, os níveis elevados de glicose plasmática, bem como o tempo de exposição, os fatores determinantes (Kahn *et al.*,2009).

1.3 Fisiopatologia do diabete: mecanismos moleculares

A ativação de diferentes vias bioquímicas, em decorrência da exposição a altas concentrações de glicose, tem sido proposta para explicar os mecanismos patogênicos no diabete (Reis *et al.*, 2008). A hiperglicemia pode ser considerada o fator iniciador das lesões oxidativas entre diabéticos. Nestes indivíduos, altas concentrações de glicose sanguínea favorecem a auto-oxidação da glicose livre, resultando na formação de cetoaldeídos reativos e consequente produção do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), um precursor de outras espécies reativas de oxigênio (ROS) (Maritim *et al.*, 2003). No meio intracelular, o $O_2^{\cdot-}$ sofre dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que se não for degradado, origina o radical hidroxil (HO^{\cdot}), outra espécie extremamente reativa. O aumento de ROS pode perturbar o equilíbrio oxidativo causando efeitos tóxicos que podem levar à morte celular (Halliwell 1999).

Além da auto-oxidação, a glicose também promove aumento da produção dos transportadores de elétrons NADH e FADH₂ pelo ciclo de Krebs (Brownlee 2005; Rolo, Palmeira 2006). O aumento do transporte global de elétrons pela cadeia transportadora mitocondrial facilita a transferência destes elétrons para o oxigênio molecular, aumentando ainda mais produção do $O_2^{\cdot-}$ (Brownlee 2005; Rolo, Palmeira 2006).

Esta superprodução mitocondrial de superóxido produz o aumento da enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP), enzima envolvida no reparo do DNA (Reis *et al.*, 2008). Além disso,

o superóxido diminui a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma enzima responsável pela metabolização final da glicose, aumentando a concentração de metabólitos glicolíticos como gliceraldeído-3-fosfato e facilitando a oxidação da glicose (Brownlee 2005).

Outro grande contribuinte para a patogênese das complicações no diabetes é o gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário da via glicolítica. O aumento citosólico do gliceraldeído-3-fosfato promove a ativação da proteína cinase C (PKC), através da formação de diacilglicerol (DAG) (Brownlee 2001). A ativação da PKC aumenta a atividade da nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NAD(P)H-oxidase), elevando a produção de ROS (Rains, Jain 2011). A PKC também modula mecanismos de transdução de sinal, sendo importante na regulação da permeabilidade vascular e contratilidade, fatores estes que contribuem para a lesão vascular, aterosclerose e cardiomiopatia diabética (Giacco, Brownlee 2010).

Durante a hiperglicemia, grande parte do excesso de glicose é desviada para a via das hexosaminas. O produto final desta via, o UDP-N-acetilglicosamina, gerado a partir da conversão de frutose-6-fosfato, afeta a expressão gênica, contribuindo para a patogênese das complicações diabéticas (Rolo, Palmeira 2006; Giacco, Brownlee 2010).

Altas concentrações de glicose também estimulam a formação de produtos avançados de glicação não enzimática (AGEs) (Bertoluci *et al.*, 2008). Neste contexto, os processos de glicação não enzimática ou reação de Maillard geram um grupo heterogêneo de moléculas químicas conhecidas como AGEs, resultado da reação não enzimática da glicose com proteínas. Além disso, os AGEs também podem ser formados a partir de intermediários α -dicarbonil altamente reativos como o glioxal e o metilglioxal (formado a partir do gliceraldeído-3-fosfato) (Gleissner *et al.*, 2007). Em diabéticos, a exposição a açúcares oxidados, associada a um aumento na concentração de lipídeos, resulta em lipoxidação e também constitui um mecanismo

intermediário na formação dos AGEs, produzindo danos estruturais e funcionais a macromoléculas (Chilelli *et al.*, 2013). Os AGEs contribuem para fisiopatologia do diabetes pois modificam proteínas intracelulares e de matriz celular, inibem a atividade de enzimas, sendo resistentes à digestão proteolítica por ação do proteossoma (Brownlee 2005). Além disso, os AGEs podem ligar-se ao seu receptor de membrana chamado RAGE aumentando produção intracelular de ROS por meio da ativação de um sistema NADPH oxidase (Rains, Jain 2011). Os produtos de glicação podem acumular-se em órgãos alvo como retina, placas ateroscleróticas e rim. O rim pode ser considerado o principal alvo das AGEs, tendo em vista que representa o maior sítio de depuração desses produtos (Reis *et al.*, 2008). Neste tecido, o acúmulo de AGEs estimula a glicação do colágeno na membrana basal renal provocando seu espessamento, reduzindo a filtração e, finalmente, levando à perda da função glomerular (Sun *et al.*, 2013).

Além disso, o aumento da glicose intracelular estimula a aldolase redutase, com consequente ativação da via dos polióis, aumentando susceptibilidade ao dano oxidativo (Lee, Chung, 1999). A aldolase redutase cataliza a conversão de glicose a sorbitol, com consumo de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (Lee, Chung, 1999). Sabe-se que o NADPH é um cofator essencial para regenerar a glutathiona reduzida, um potente antioxidante endógeno. A redução na biodisponibilidade da glutathiona reduzida potencializa o dano oxidativo pelo diabetes (Lee, Chung, 1999). É interessante observar que, a superexpressão da enzima aldolase redutase em ratos diabéticos aumenta a formação de placas de ateroma e reduz a expressão de genes que regulam a regeneração de glutathiona (Giacco, Brownlee 2010). Por outro lado, o sorbitol é lentamente convertido à frutose, acumulando-se no meio intracelular e gerando um desequilíbrio osmótico, levando ao aumento de influxo de líquido, alterações na permeabilidade da membrana e ruptura celular, potencializando o dano celular (Brownlee 2001; Gleissner *et al.*, 2007).

Outro possível mecanismo envolvido com dano celular pelo diabetes pode ser explicado pelo desvio da glicose para a via das hexosaminas. O produto final desta via, o UDP-N-acetilglicosamina, gerado a partir da conversão de frutose-6-fosfato, afeta a expressão gênica, contribuindo para a patogênese das complicações diabéticas (Rolo, Palmeira 2006; Giacco, Brownlee 2010).

De fato, a autooxidação da glicose, a superprodução de ROS pela mitocôndria, o aumento do fluxo de glicose através da via polioliol e da hexosamina, assim como a formação de AGEs e activação da PKC podem ser considerados os principais mecanismos causadores de dano celular em diabéticos (Figura 1) (Brownlee 2005; Maritim *et al.*, 2003; Rolo, Palmeira 2006; Gleissner *et al.*, 2007; Giacco, Brownlee 2010). No entanto, independente do mecanismo deletério ativado, a produção aumentada de ROS parece ser o mediador central, comum a todas as células lesadas, sendo essa hipótese capaz de unificar todas as vias (Brownlee 2005). Sob condições hiperglicêmicas e níveis excessivamente elevados de ROS, a célula fica exposta a um ambiente de estresse oxidativo, o que prejudica sua homeostase e sobrevivência (Maritim *et al.*, 2003).

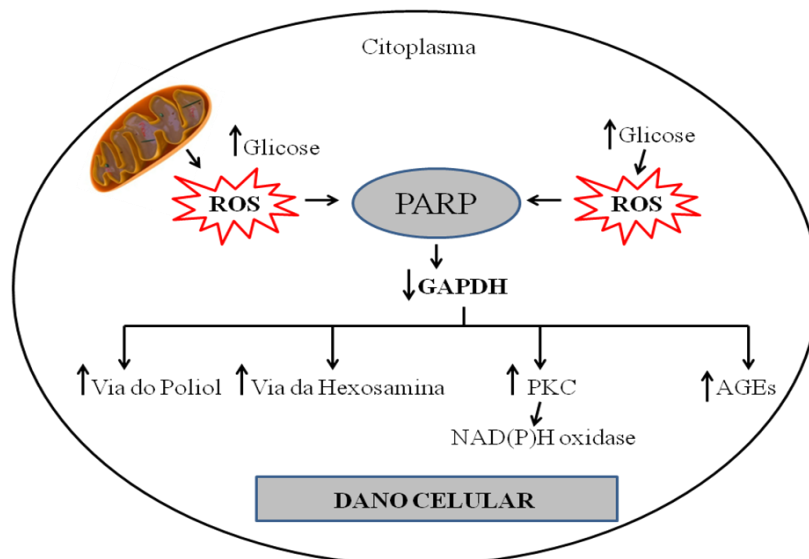


Figura 1. Unificação de mecanismos intracelulares causadores de dano no diabetes (Adaptado de Brownlee, 2004).

1.4 Fisiopatologia do diabete: estresse oxidativo

Conforme já mencionado, a hiperglicemia pode ser considerada um fator iniciador das lesões oxidativas entre diabéticos. A direção de muitos processos celulares, tais como fosforilação e desfosforilação e regulação do ciclo celular, pode ser determinada pelo estado de redox (Rais, Jain 2011). Em condições fisiológicas, a homeostase é mantida pelo balanço entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes (Halliwell, 1992; Halliwell, Gutteridge 1999). O desequilíbrio no estado redox, observado entre diabéticos, leva a uma condição denominada estresse oxidativo e/ou nitrosativo, sendo definido atualmente como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e do controle redox e/ou a um dano molecular (Jones, 2006; Pacher *et al.*, 2005).

A principal via biológica de formação de ROS é o transporte de elétrons associado às membranas mitocondriais, onde ocorre a redução completa do oxigênio molecular (O_2). Esta reação requer a transferência de quatro elétrons, que ocorre diretamente nos complexos enzimáticos, resultando na formação de água (Junior *et al.*, 2005). Porém, poderá acontecer uma redução incompleta do O_2 , devido a uma transferência univalente de elétrons, envolvendo a formação de intermediários radiculares ou não (Guaratini *et al.*, 2007).

À exceção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as ROS tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ânion radical hidroxil (HO^{\bullet}), dentre outras, são muito instáveis e altamente reativas (Halliwell, Gutteridge 2007). No meio intracelular, o $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação a H_2O_2 , que se não for degradado pelas enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), formará radical HO^{\bullet} ao reagir com o íon ferroso ou cúprico, na reação de Fenton. Na presença de íons divalente e metais de transição, o radical HO^{\bullet} também pode ser gerado a partir da reação do $O_2^{\bullet-}$ com H_2O_2 (Halliwell, Gutteridge 1999). O $O_2^{\bullet-}$ também pode reagir com o óxido nítrico formando o peroxinitrito, um radical altamente deletério (Pacher *et al.*, 2005). A reação de Haber-Weiss descreve a formação do radical HO^{\bullet} a partir da reação do $O_2^{\bullet-}$ com H_2O_2 , na presença de íons divalente e metais de

transição (Halliwell, Gutteridge 2007). Além das ROS, também estão envolvidas nos processos redox outras espécies intermediárias como as espécies reativas de nitrogênio (ERN), tais como óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e peroxinitrito (ONOO^\cdot) ambas com importância significativa no desenvolvimento do estresse nitrosativo e complicações em diabéticos (Pacher *et al.*, 2005; Valco *et al.*, 2007).

Dentre os mecanismos causadores de lesão celular, a lipoperoxidação é considerada o mecanismo de agressão mais comum. Neste processo ocorre a degradação oxidativa dos lipídeos de membrana, causada pela ação das espécies reativas, promovendo grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana (Moore, Roberts 1998). Dessa forma, poderá ocasionar a perda da seletividade da membrana, assim como a liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos até a morte celular (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Em diabéticos, lesões teciduais e celulares podem ser provocadas por um aumento na concentração de ROS ou ERN associado à deficiência da capacidade antioxidante endógena (Maritim *et al.*, 2003). Esse desequilíbrio está associado a alterações bioquímicas em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, prejudicando a homeostase e a função celular, determinantes para as alterações fisiopatológicas no DM e aparecimento de suas complicações (Maritim *et al.*, 2003; Brownlee 2001).

De fato, a hiperglicemia tem um papel chave no início da doença, enquanto que o estresse oxidativo perpetua o dano tecidual e a progressão das complicações diabéticas a longo prazo (Brownlee 2001; Giacco, Brownlee 2010). Neste contexto, o sistema de defesa antioxidante atua tentando minimizar estes efeitos.

O sistema de defesa antioxidante neutraliza os efeitos danosos das espécies reativas (Halliwell, Gutteridge, 2007). Pode-se definir como antioxidante qualquer substância que quando presente em pequenas concentrações, comparado ao substrato oxidável, retarda ou impede a

oxidação desse substrato (Halliwell, 1992). Os antioxidantes atuam como detoxificadores, prevenindo a formação das espécies reativas, impedindo a lesão celular ou combatendo-a após terem sido formadas (Ferreira, Matsubara 1997).

Dentre os antioxidantes enzimáticos celulares encontram-se as enzimas SOD, CAT e GPx, que proveem a primeira linha de defesa endógena presentes não só no citosol, mas também nas mitocôndrias, local de produção de boa parte das ROS (Ferreira, Matsubara 1997).

Nos sistemas eucariontes, SOD nas suas diferentes isoformas dismuta íons superóxido gerando H_2O_2 . A isoforma citosólica apresenta cobre e zinco no seu sítio catalítico, sendo denominada Cu/Zn-SOD. Já a isoforma mitocondrial, Mn-SOD, apresenta um átomo de manganês em seu sítio ativo, cuja expressão é induzida pela presença deste metal (Ferreira, Matsubara 1997; Maritim *et al.*, 2003). A superexpressão da Mn-SOD em ratos diabéticos, por exemplo, previne alterações morfológicas no coração, protege a mitocôndria cardíaca dos danos oxidativos e normaliza a contratilidade em cardiomiócitos (Shen *et al.*, 2006).

O H_2O_2 gerado é degradado a oxigênio e água pela catalase, uma enzima situada no peroxissoma, cujo sítio ativo contém um grupo heme (Vasconcelos *et al.*, 2007). A CAT não apresenta atividade para hidroperóxidos orgânicos (ROOH), sendo altamente específica para H_2O_2 e presente em diversos tecidos, como fígado, coração e no rim (Maritim *et al.*, 2003). Em diabéticos, as altas taxas de glicação e oxidação podem inibir a atividade da SOD e da CAT. Entretanto, variações nas atividades destas enzimas podem ser observadas ao longo do tempo, podendo ser encontrado um aumento compensatório na atividade enzimática em decorrência da produção de espécies reativas e estresse oxidativo, gerado pelo diabete (Giugliano *et al.*, 1996).

Corroborando com o sistema de defesa enzimático, a enzima GPx, uma seleno proteína encontrada na maioria dos tecidos, cataliza a decomposição tanto de ROOH como de H_2O_2 (Vasconcelos *et al.*, 2007). Nessa reação a GPx converte os peróxidos a água usando a glutathiona reduzida (GSH) como um doador de hidrogênio, formando o dissulfeto de glutathiona (GSSG). A

reciclagem da glutathiona ocorre pela ação da glutathiona redutase, que cataliza a conversão de GSSG a GSH, mantendo íntegro o principal sistema de proteção antioxidante celular não enzimático (Halliwell, Gutteridge 1999). Em diabéticos, a redução nos níveis de glutathiona no pâncreas pode refletir uma reação direta entre a GSH e as espécies reativas geradas pela hiperglicemia crônica, ocasionando uma depleção da resposta antioxidante (Sefi *et al.*, 2010).

Participam do sistema antioxidante não enzimático algumas substâncias antioxidantes endógenas podendo-se destacar a melatonina e a melanina, hormônios como estradiol e estrógeno (Vasconcelos *et al.*, 2007) e a glutathiona, esta última considerada o mais importante tampão redox intracelular, por participar de reações de oxi-redução, protegendo a célula contra agressões de inúmeros agentes (Maritim *et al.*, 2003). A GSH é considerada um dos mais abundantes e importantes tióis (-SH) intracelulares presente na maioria das células. O grupamento sulfidríla presente na cisteína atua como um doador de elétron o que determina a capacidade redutora da GSH (Halliwell, Gutteridge 1999).

Ainda, participam do sistema antioxidante algumas substâncias provenientes da dieta tais como minerais (zinco e selênio), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A, riboflavina), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína) e polifenóis (taninos, flavonoides, estilbenos) (Landete, 2013; Leite, Sarni 2003; Ratnam *et al.*, 2006; Kharrazi *et al.*, 2008). No diabete sabe-se que alguns micronutrientes e vitaminas estão deficientes. A suplementação de magnésio e vitamina B6 (piridoxina), por exemplo, podem reduzir o risco de complicações em diabéticos, pois atuam como cofatores essenciais para o funcionamento da maquinaria enzimática, bem como reduzem a tolerância à glicose, melhoram a função da célula beta-pancreática e secreção de insulina (Marcelino, Pinhão 2007).

Sendo assim, a administração de produtos naturais com atividade antioxidante também pode ser considerada uma importante estratégia para equilibrar a homeostase celular, especialmente no diabete (Chis *et al.*, 2009; Holst, Williamson 2008). Nesta perspectiva,

fitoquímicos biotivos provenientes de diferentes partes de plantas como, sementes, folhas, raízes e frutos assumem grande importância como possíveis agentes protetores frente ao dano oxidativo (Ferreira, Abreu 2007). Inúmeros estudos demonstram que a administração de antioxidantes exógenos, presentes na uva e seus subprodutos, podem auxiliar o sistema antioxidante endógeno a combater a injúria celular provocada pelas espécies reativas (Erejuwa *et al.*, 2010; Nixdorf e Gutierrez, 2010; Feillet-Condray *et al.*, 2009).

1.5 Uva e fitoquímicos bioativos

A Serra Gaúcha é a região vitivinícola mais importante do Brasil, onde são produzidos anualmente aproximadamente 430 milhões de litros de vinho, sucos e derivados, representando 95% da produção nacional (EMBRAPA 2013; Rizzon *et al.*, 2008). Em 2010, o cadastro vitícola nacional registrou a utilização de 526 milhões de kg de uva para a produção dos derivados da uva, direcionados ao suprimento do mercado interno e externo, contribuindo substancialmente para a economia da região sul do país (EMBRAPA 2013).

Em relação aos cultivares difundidos na Serra Gaúcha, cerca de 90% da superfície é ocupada por videiras do grupo das americanas e híbridas, com predominância da Isabel, Bordô e Concord de *Vitis labrusca*, que são cultivares rústicos e mais produtivos, em relação à espécie *Vitis vinifera* (Rizzon, Miele 2006). Os sistemas de plantio variam de uma região para outra e o manejo de produção se alterna, de acordo com a variedade cultivada. As videiras podem ser cultivadas por método convencional ou orgânico. O método convencional permite a utilização de agrotóxicos, pesticidas e manipulação por engenharia genética, enquanto o método orgânico, ou biológico, proíbe a utilização de quaisquer substâncias químicas, seguindo normas pré-estabelecidas pela "International Federation of Organic Moviments (IFOAM)" (EMBRAPA 2013; IFOAM 2013). Tais métodos de cultivo influenciam na composição química da uva. Na

região sul do Brasil, viticultores que cumprem as normas de produção orgânica recebem a certificação da Rede Ecovida de agroecologia (ECOVIDA 2013).

A composição química da uva varia de acordo com fatores como: maturidade, variedade, tipos de solos, variações de clima e práticas de plantio (Soyer, Koka, Karadeniz, 2003). Quanto à composição química, a uva possui glicose, frutose, potássio (K^+), baixo teor de sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) magnésio (Mg^{2+}), fósforo (P^{3+}) ferro (Fe^{3+}), além dos compostos fenólicos (Brunetto *et al.*, 2009; Miele *et al.*, 1990). Dentre os compostos fenólicos, os mais abundantes são as antocianinas, os taninos e os ácidos fenólicos, que conferem à uva diferença de cor e adstringência (Brunetto *et al.*, 2009; Miele *et al.*, 1990). Durante o cultivo de videiras, a biossíntese de polifenóis está relacionada a processos vitícolas (Boulton *et al.*, 1995).

Neste contexto, a viticultura orgânica pode aumentar o conteúdo fenólico da planta. A ausência de utilização de produtos químicos deixa a videira mais vulnerável às agressões externas, o que contribui para a produção de compostos fenólicos, já que estes fitoquímicos fazem parte do sistema de defesa da planta, dentre outras funções (Herman 1976). Videiras cultivadas por métodos orgânicos se desenvolvem e amadurecem mais lentamente do que as plantas cultivadas pelo método convencional. Como os flavonoides são produzidos no período de desenvolvimento e maturação, sua concentração está aumentada em cultivares orgânicos (Grinder-Pedersen 2003).

Interessantemente, Dani e colaboradores (2007) mostram maior atividade antioxidante da uva cultivada pelo método orgânico quando comparado ao método convencional. Estes autores propõem que a maior atividade antioxidante do suco de uva orgânica esteja relacionada às maiores concentrações de polifenóis totais, resultado dos processos envolvendo o cultivo.

Na comunidade científica os polifenóis têm recebido atenção especial diante das ações benéficas à saúde humana (Rodrigo *et al.*, 2011; Quiñone *et al.*, 2013). Estudos revelam a ação antioxidante e quimioprotetora dos polifenóis contidos na uva e seus derivados (Nixdorf e

Gutierrez, 2010; Feillet-Condray *et al.*, 2009; Dani *et al.*, 2008; Zern e Fernandez, 2005). Os benefícios potenciais produzidos pelo consumo da uva estão associados à manutenção da função endotelial, diminuição da agregação plaquetária, aumento da capacidade antioxidante, bem como prevenção de dano ao DNA (Pontes *et al.*, 2010; Rho e Kim, 2006; Park *et al.*, 2003). Os possíveis efeitos benéficos desses fitoquímicos não são produzidos somente pela uva, mas podem ser produzidos também em decorrência da administração de subprodutos, como o vinho, suco de uva e semente, porém poucos estudos exploram as propriedades terapêuticas da folha da videira (Dani *et al.*, 2010; Suwannaphet *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2013).

1.6 Farmacologia dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, podem ser definidos como metabólitos secundários sintetizados por plantas, envolvidos em diversos processos como crescimento, lignificação, pigmentação, polinização, resistência contra patógenos, predadores e estresse ambiental (Duthie *et al.*, 2003).

A formação dos polifenóis em plantas é influenciada por inúmeros fatores, incluindo a incidência de luz, genética vegetal, ambientais condições de germinação, grau de maturação, bem como a variedade de espécies (Ross 2002).

Estruturalmente, os polifenóis são compostos que possuem um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados a um anel de benzeno (Figura 2A) e podem ser classificados como flavonoides e não flavonoides (Figura 2B) (Fraga *et al.*, 2010). Em videiras, os polifenóis estão distribuídos principalmente nas folhas, caule, semente e raiz (MIELE *et al.*, 1990). Os principais compostos fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavanóis flavonóis e catequinas), protocianidinas, estilbenos (resveratrol), e os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) (Mazza 1995). Estes compostos apresentam importantes propriedades farmacológicas

como, captura de radicais totais, modulação na atividade enzimática, inibição da proliferação celular, dentre outras (Rodrigo *et al.*, 2011).

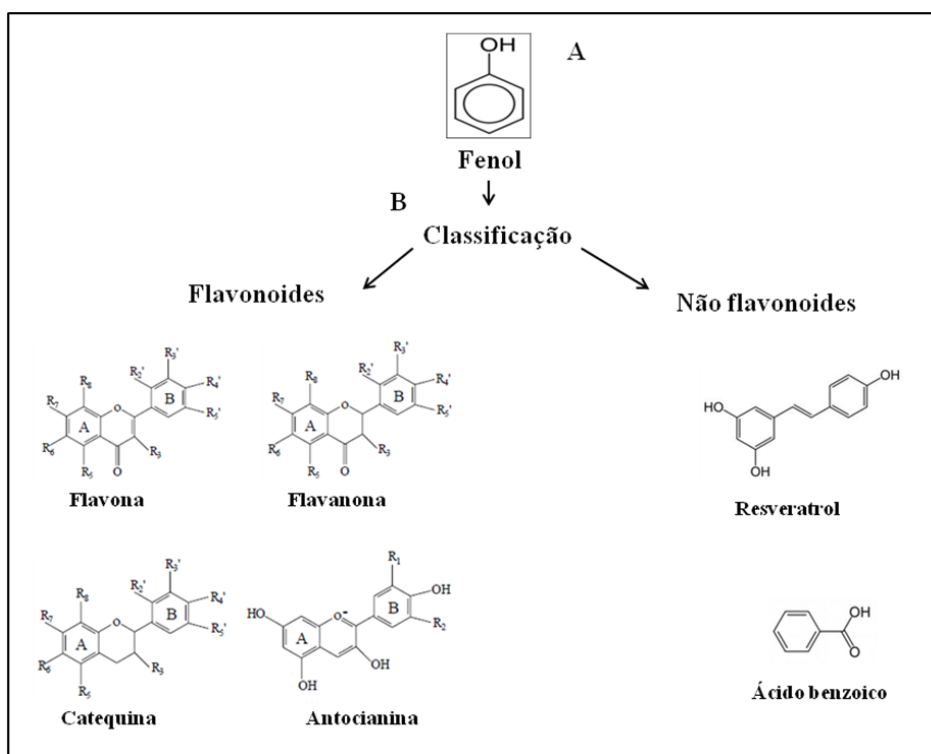


Figura 2. Estrutura básica (A) e classificação (B) dos polifenóis (Adaptado de: Fraga *et al.*, 2010).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura, atribuída ao poder redutor do grupamento OH aromático, que doa um átomo de hidrogênio ao radical livre, uma espécie química que possui um elétron desemparelhado no seu último orbital, estabilizando-o (Ross, Kasum 2003). Consequente à perda de um elétron, o composto aromático gera o radical fenoxila, sendo estabilizado por ressonância (Ross, Kasum 2003). A eficiência antioxidante dos polifenóis pode ser influenciada pelo número e posição dos grupos OH e menor impedimento estérico no sítio de abstração de um elétron (Fraga *et al.*, 2010). Os polifenóis são

capazes de estabilizar os radicais superóxido, hidroxil, óxido nítrico, peroxinitrito, dentre outros (Cerqueira *et al.*, 2007).

Consequentemente, os polifenóis interferem sobre mecanismos de lipoperoxidação, ao inibirem a oxidação de lipídeos de membrana celular, impedindo a formação de um conjugado dieno, considerado o iniciador desta via, bloqueando a reação em cadeia (Fraga *et al.*, 2010).

Os polifenóis também podem ativar sistemas de desintoxicação celular, potencializando a ação de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx, ou ainda inibindo enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase, responsáveis pela geração intracelular de espécies reativas (Nijveldt *et al.*, 2001; Quiñone *et al.*, 2013). Polifenóis também apresentam propriedades antioxidantes ao ativarem fatores de transcrição como o Nrf2, um importante regulador da resposta antioxidante (Kaspar *et al.*, 2009; Palsamy, Subramanian 2011). Frente ao aumento do estresse oxidativo, como em situações de hiperglicemia crônica, polifenóis como o resveratrol aumentam a expressão de Nrf2, promovendo melhora no estado redox no tecido renal de ratos diabéticos (Palsamy, Subramanian 2011).

Adicionalmente à neutralização das espécies reativas, os compostos fenólicos atuam como quelantes de metais como cobre e ferro, inibindo a formação de radicais totais, através das reações de Fenton e Haber-Weiss (Rodrigo *et al.*, 2011).

Os benefícios potenciais produzidos pelo consumo de subprodutos da uva também estão associados à regulação do metabolismo energético (Monteiro *et al.*, 2009). Estudos mostram que o consumo de polifenóis diminui a quantidade de energia ingerida e protege contra o ganho de peso corporal induzido pela ingestão de dieta hiperlipídica (Feillet-condray *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2009; Vadillo *et al.*, 2006; Pal *et al.*, 2004). A suplementação com extrato de semente de uvas em ratos tratados com uma dieta rica em frutose reduz significativamente a glicemia de jejum, o índice HOMA-IR (razão entre insulinemia e glicemia de jejum) e a lipoperoxidação hepática, demonstrando os efeitos benéficos da uva neste modelo experimental

(Suwannaphet *et al.*, 2010). Em camundongos diabéticos, a administração de extrato das cascas de uva diminui a glicemia pós prandial (Zhang *et al.*, 2011). Esse efeito do extrato da casca da uva é atribuído à inibição enzimática da α -glicosidase, uma enzima fundamental para a hidrólise de amido e absorção intestinal de glicose (Zhang *et al.*, 2011).

Embora a uva e seus subprodutos tenham sido alvo de inúmeros estudos, pouco se sabe sobre as possíveis propriedades antioxidantes das substâncias presentes na folha de videira. Um estudo *in vitro* demonstrou efeito neuroprotetor do extrato de folha de videira sobre diferentes estruturas cerebrais expostas a um agente pró-oxidante, que diminui a oxidação de lipídios e proteínas pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Dani *et al.*, 2010). Oliboni e colaboradores (2011) também evidenciam o efeito hepatoprotetor, cardioprotetor e nefroprotetor *in vitro* dos polifenóis da folha de videira frente ao dano lipídico e proteico provocado pela exposição ao peróxido de hidrogênio.

Sendo assim, não se descarta que a folha da videira também possa apresentar efeito antioxidante em diabéticos, especialmente quando cultivada na ausência de agrotóxicos ou fertilizantes não orgânicos. A utilização das folhas de videira orgânica para a obtenção de compostos fenólicos pode ser economicamente favorável para os viticultores, pois além de contribuir para um melhor reaproveitamento da videira como um todo, contribui para um desenvolvimento da vitivinicultura mais sustentável.

Adicionalmente, pode-se ressaltar que a utilização das folhas da uva como fonte de compostos fenólicos pode apresentar vantagem em relação ao consumo de suco de uva, uma vez que altas concentrações de carboidratos tornam essa bebida altamente energética (Rizzon *et al.*, 2003). Outra vantagem adicional do extrato de folha de videira se refere ao vinho, uma vez que devido à presença de etanol que é contraindicado para hepatopatas e nefropatas, além de aumentar o risco de dependência química (Malacrida, Motta 2005).

Portanto, faz-se necessário explorar as possíveis propriedades terapêuticas do extrato de folhas de videiras sobre parâmetros metabólicos de estresse oxidativo em diferentes tecidos de animais diabéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito do extrato de folhas de videiras da variedade Bordô (*Vitis labrusca*), produzidas por cultivo orgânico, sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em ratos diabéticos.

2.2 Objetivos Específicos

- ⇒ Determinar o conteúdo fenólico do extrato da folha de videira orgânica;
- ⇒ Determinar o efeito do tratamento crônico do extrato aquoso de folhas de videira orgânica, da variedade Bordô, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, sobre a ingestão alimentar e hídrica e eficiência alimentar de animais diabéticos e não diabéticos;
- ⇒ Avaliar variações de medidas ponderais - peso e índice de massa corporal (índice de Lee) de ratos diabéticos e não diabéticos tratados cronicamente com extrato aquoso de folhas de videira orgânica, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg;
- ⇒ Avaliar o efeito do tratamento crônico com diferentes concentrações do extrato aquoso de folha de videira orgânica sobre o peso relativo de tecidos como fígado, coração, rim, gorduras retroabdominal e epididimal;
- ⇒ Avaliar o efeito do tratamento crônico do extrato de folhas de videira, administrado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, sobre a glicemia de jejum e pós-sobrecarga de glicose em ratos diabéticos e não diabéticos;
- ⇒ Avaliar o efeito do tratamento crônico do extrato de folhas de videiras nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, sobre parâmetros lipídicos como colesterol total, HDL, LDL, VLDL em ratos diabéticos e não diabéticos;

- ⇒ Avaliar o efeito do tratamento crônico do extrato de folhas de videiras nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg sobre função hepática e renal através de parâmetros bioquímicos como AST, ALT, creatinina e ureia em ratos diabéticos e não diabéticos;
- ⇒ Determinar as propriedades antioxidantes do extrato aquoso de folhas de videira da variedade Bordô, produzida por cultivo orgânico, após administração crônica de 50, 100 e 200 mg/kg, sobre o fígado, coração e rim de animais diabéticos e não diabéticos pela mensuração de dano lipídico (TBARS), proteico (carbonila), antioxidante não enzimático (sulfidrilas) e da atividade de enzimas antioxidantes (SOD e CAT);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 88 ratos Wistar, machos, adultos (90 dias), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, agrupados (n = 5/caixa) em caixas de polipropileno (33 x 17 x 40 cm), sob condições de iluminação claro-escuro de 12 horas (7:00–19:00h), temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade (65%) controladas. Os animais tinham livre acesso à água e alimento, exceto no dia da determinação da glicemia de jejum e pós- sobrecarga de glicose (jejum de 8 horas) e no último dia do experimento, anterior à eutanásia (jejum de 12 horas). O experimento teve início apenas após aprovação pelo CEUA/UFRGS (nº 22445), seguindo as normas do CONCEA e leis internacionais que regem os cuidados éticos no manejo de animais. Todos os esforços foram feitos para minimizar o desconforto ou o estresse dos animais.

3.2 Indução do diabetes

O diabetes foi induzido nos ratos (n = 48) pela administração de 60 mg/kg de estreptozotocina (Sigma, St. Lewis, USA), via intraperitoneal (ip), dissolvida em tampão citrato (pH 4,5) e preparada imediatamente antes do uso. Nos ratos controle (n = 40) foram administrados com tampão citrato de forma que todos os animais recebessem o equivalente a 1 mL/kg. Após 48 horas da administração, o diabetes foi confirmado em aparelho portátil (Glucotrend, Boehringer Institute, Mannheim, AL) a partir de uma gota de sangue retirada da porção distal da cauda do rato (Figura 1). Os animais que apresentaram glicemia capilar inferior a 200 mg/dL foram excluídos do estudo.

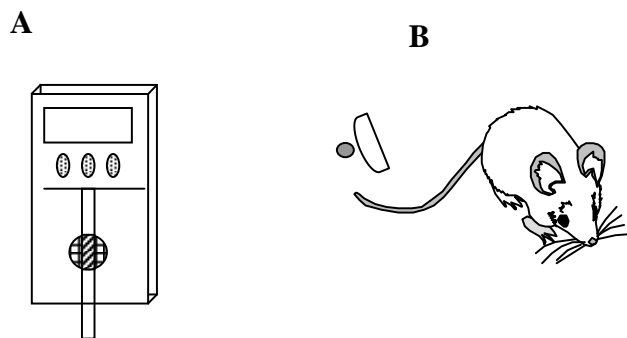


Figura 3. Estimativa da glicose capilar dos animais diabéticos e não diabéticos. **A**: Aparelho para determinação da glicemia e **B**: coleta de sangue por punção na porção distal da cauda do rato.

3.3 Extrato de folha de videira orgânica

3.3.1 Identificação botânica

As folhas de *Vitis labrusca*, variedade Bordô, foram colhidas de cultivares orgânicos do Município de Flores da Cunha/RS e certificados pela ECOVIDA – uma entidade agroecológica que avalia plantações e certifica manejo orgânico na produção (www.ecovida.org.br). As folhas foram coletadas no mês novembro de 2012, ao final da floração e antes da frutificação e foram identificadas pelo botânico Amaury Silva Júnior, responsável pelo Herbário do Centro Universitário Metodista do IPA.

3.3.2 Obtenção do extrato aquoso bruto

Para o preparo do extrato bruto, o método extrativo utilizado foi o sistema fechado de aquecimento sob refluxo. As folhas frescas foram pesadas (2.227,45 g), trituradas e colocadas em um balão de fundo redondo, contendo água destilada na proporção de 1:10 (planta/solvente). O balão foi colocado sobre uma manta de aquecimento acoplado a um condensador por 1 hora.

Para a remoção do solvente e obtenção do extrato bruto, foi utilizado banho-maria a 60°C até a secagem total. A massa total de extrato aquoso bruto obtido corresponde a 113,43 g, equivalente a um rendimento de 5%. Durante o período experimental, a cada cinco dias, o extrato bruto resultante foi reconstituído em solução salina a 0,9% estéril, na concentração de 50, 100 e 200 mg/mL, acondicionado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração. O extrato foi administrado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg de peso do animal. Essas doses foram selecionadas com base em estudos anteriores (Orhan *et al.*, 2006; 2007). O conteúdo total de polifenóis e o teor de flavonoides foram quantificados por método espectrofotométrico de acordo com a metodologia de Singleton e colaboradores (1999) e Monagas e colaboradores (2003), respectivamente. A concentração de naringina, resveratrol, catequina e epicatequina foi determinada por CLAE segundo metodologia específica (Saucier *et al.*, 2003; Hector *et al.*, 1996).

3.4 Procedimento experimental

Após confirmação do diabete e 72 horas da administração da estreptozotocina os animais dos grupos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) foram reagrupados para receberem doses diárias de salina (CTR0 e STZ0) ou extrato aquoso da folha da videira da variedade Bordô, cultivada pelo método orgânico, nas concentrações de 50, 100 ou 200 mg/kg (CTR50, CTR100, CTR200 e STZ50, STZ100, STZ200), administrados via oral, por gavagem, durante 30 dias, uma vez ao dia.

No 28º dia os animais foram mantidos em jejum por 8 horas para avaliação do teste oral de tolerância a glicose. A glicemia capilar de jejum foi avaliada imediatamente antes da administração do extrato com auxílio de aparelho portátil. Após 30 minutos da administração, foi administrado ao animal uma solução glicosada 2 g/kg, via oral, para avaliação da curva glicêmica, conforme descrito abaixo. No 30º dia, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e eutanasiados por decapitação após 30 minutos da administração do extrato. O sangue

troncular foi coletado para determinações bioquímicas e os tecidos foram dissecados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior armazenamento em biofreezer (-80° C) e determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

A definição do número de animais por grupo experimental foi feita com base em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, bem como na literatura científica (Gomez *et al.*, 2003; Caletti *et al.*, 2012). Este número de animais representa o número mínimo necessário para a produção de dados científicos confiáveis.

3.5 Monitoração do consumo de ração e de água

A ração padrão de laboratório (Nuvilab, São Paulo, SP) e a água ingerida pelos animais foram pesadas a cada dois dias para avaliação do efeito do extrato de folha de videira sobre o comportamento alimentar e hídrico. Para estimar o consumo individual de água e ração foi considerado o total ingerido dividido pelo número de animais por caixa (n = 5). O índice de eficiência alimentar (IE) foi calculado pela relação entre a variação de peso total e ingestão de alimento ($IE = \text{variação de peso (g)}/\text{consumo de ração (g)} \times 100$).

3.6 Avaliação de medidas ponderais

Os animais foram pesados duas vezes por semana para reajuste de dose e também para avaliação do efeito do tratamento com o extrato sobre a variação temporal de peso corporal. No último dia de tratamento, além do peso corporal, foi mensurada a estatura do animal (comprimento naso-anal) para determinação do índice de massa corporal para roedores (índice de Lee = raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) (Bernardis, Patterson, 1968). Após a eutanásia, foi mensurado também o peso do fígado, coração, rim e das gorduras retroabdominal e epididimal para inferência de toxicidade sobre os diferentes tecidos pela

administração das diferentes concentrações do extrato de folhas de videira (Mukinda, Eagles 2010).

3.7 Determinação dos parâmetros bioquímicos

No 30º dia, após 12 horas de jejum e 30 minutos da administração do extrato ou salina, os ratos foram eutanasiados por decapitação e o sangue troncular foi coletado, centrifugados sob refrigeração (1000g, 5 min., 5 °C) e congelado em biofreezer a -80C para posterior determinação dos parâmetros bioquímicos. As concentrações da glicemia de jejum, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bem como colesterol total, HDL-C, creatinina e ureia, foram determinadas com auxílio de kits comerciais (LABTEST, São Paulo, SP), específicos para cada ensaio, por método colorimétrico ou enzimático em aparelho automatizado (CT 600 I, Labimbráz, Buenos Aires, Argentina). Os valores de LDL-C e VLDL-C foram obtidos através de cálculos utilizando-se a fórmula de Friedwald (Mota, 2003).

3.7.1 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Para avaliar a influência do extrato sobre os níveis glicêmicos após a ingestão de sobrecarga de glicose, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG), no 28º dia de tratamento. Após jejum de 8 horas, foi administrada uma solução de glicose na concentração de 2 g/kg por animal, por via oral (gavagem). A glicemia foi avaliada antes da administração da glicose, período que corresponde ao tempo 0, e após 30, 60 e 120 minutos da administração oral da glicose (Nain *et al.*, 2012). A glicemia de jejum e após sobrecarga de glicose ao longo do tempo foi determinada com um aparelho portátil (Glucotrend, Boehringer Institute, Mannheim, Germany) (Figura 3-A). Após uma pequena incisão na porção distal da cauda do rato (Figura 3-B) a tira de teste, já acoplada ao aparelho, foi aproximada da gota de sangue para leitura e medida da glicemia. Esse método foi escolhido pelo fato de dispensar o emprego de anestésicos

que poderiam interferir sobre a glicemia (Guarino *et al.*, 2013), bem como pelo menor grau de estresse, uma vez que os animais já eram manipulados pelo mesmo pesquisador.

3.8 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo foram utilizados o tecido hepático, o tecido cardíaco e o tecido renal.

3.8.1 Preparo dos homogeneizados

As amostras de fígado, coração e rim foram pesadas e homogeneizadas por 30 segundos em Ultra Stirrer (modelo Ultra 80) na presença de tampão KCl a 1,15% (5 mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), um inibidor de proteases, na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 µL para cada mL de KCl adicionado a amostra). Na sequência, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 1000g em centrífuga refrigerada (Universal 320 R, Hettich). O sobrenadante foi coletado e congelado em biofreezer à -80C para posterior determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

3.8.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinação do dano lipídico, 50 µL de sulfato duodecil de sódio (SDS) a 8,1% (p/v) foram adicionados a 200 µL do homogeneizado, seguido de 375 µL de ácido acético a 20% (p/v), pH 3,5 (Ohkawa *et al.*, 1979). Na sequência foi adicionado 375 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA), que reage com os produtos da lipoperoxidação, formando um composto de coloração rosada. A absorbância foi lida a 535 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP 220, São Paulo, Brasil). Malondialdeído comercialmente disponível foi usado como padrão. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de proteína.

3.8.3 Grupamentos Tióis Totais (sulfidrilas)

Em 14 μL de sobrenadante da amostra homogeneizada foi adicionado 16 μL de 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) a 10mM que, reagindo com os grupamentos tióis proteicos da amostra, gera um derivado de cor amarelo lido no espectrofotômetro (Bioespectro SP 220, São Paulo, Brasil) a 412 nm (Aksenov, Markesbbery, 2001). Como muitas proteínas possuem resíduos de cisteína, com grupamentos sulfidrilas (SH) totais que podem ser oxidados pela ação de espécies reativas, a quantificação das sulfidrilas totais é inversamente proporcional ao dano protéico. Os resultados foram expressos como nmoL/mg de proteína.

3.8.4 Concentração de Proteínas Modificadas por Mecanismo Oxidativo: Carbonilas Proteicas

À 25 μL de sobrenadante da amostra homogeneizada foi adicionada 100 μL de dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 10mM (dissolvido em HCl a 2M), resultando na produção de dinitrofenilhidrazona, um produto da reação entre DNPH e grupamentos carbonilas presentes em proteínas danificadas por ROS (Reznick, Pacher, 1994). A absorbância foi determinada por espectrofotometria (UV/VIS Double Beam (T80), Pequim, China) a 370 nm e os resultados expressos como nmol por mg de proteína.

3.8.5 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Para este ensaio, a mostra homogeneizada foi utilizada em três diferentes volumes (10, 25 e 50 μL). Esta técnica baseia-se na inibição do radical superóxido pela enzima SOD presente na amostra. A SOD compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação de 17 μL adrenalina a 60 mM leva à formação de um composto colorido, o adrenocromo, que foi determinado espectrofotometricamente (Bioespectro SP 220, São Paulo, Brasil) a 480 nm. Os resultados foram expressos em USOD por mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida

como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação da adrenalina (Bannister, Calabrese 1987).

3.8.6 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

Em uma cubeta de quartzo contendo 1960 μL de tampão fosfato (pH 7) foram adicionados 20 μL de homogeneizado e 20 μL de peróxido de hidrogênio a 0,3 M (Aebi, 1984). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (UV/VIS Double Beam (T80), Pequim, China) a 240 nm nos tempos 0, 30 e 60 segundos. A atividade da enzima CAT é diretamente proporcional à velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, obedecendo a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Os resultados foram expressos em unidades de catalase (UCAT) por mg de proteína.

3.9 Dosagem de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry *et al* (1951), usando-se albumina sérica bovina na concentração de 1 mg/mL como padrão.

3.10 Compostos fenólicos do extrato da folha de videira

O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado de acordo com Singleton e colaboradores (1999), por um ensaio adaptado do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por mL. A quantificação de flavonoides foi mensurada, segundo a metodologia de Monagas e colaboradores (2003). A concentração de naringina, resveratrol, catequina e epicatequina foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (HP 1100, Linchrospher RP 18) equipada com um detector de UV e um sistema de bomba quaternário. A quantificação de naringina, catequina e epicatequina foi determinada segundo a metodologia de Saucier e colaboradores (2003). Já, a quantificação de

resveratrol foi realizada de acordo com Hector e colaboradores (1996). Os resultados foram expressos por $\mu\text{g/mL}$.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram reunidos em banco de dados e testados para distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilks. Parâmetros com distribuição normal foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias considerando-se como variáveis independentes a condição de diabete e o tratamento com as diferentes concentrações do extrato de folha de videira. Para detectar diferença entre os grupos dos dados paramétricos foi selecionado o teste de Bonferroni. Para resultados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunnett para detecção de diferença entre os grupos. Para avaliação do consumo de ração e água ao longo do tempo, bem como para variações da curva glicêmica, foi utilizada ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Diferença estatisticamente significativa foi considerada apenas para valores com $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Conteúdo total de polifenóis

A quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides do extrato aquoso da folha de videira orgânica é apresentada na tabela 1, mostrando que dentre os flavonoides a naringina aparece como o mais prevalente, seguida de catequinas e epicatequinas. Também foi detectada a presença de resveratrol, um não flavonoide.

Tabela 1: Conteúdo total fenólico do extrato aquoso de folha de videira orgânica

	Polifenóis totais (mg de ácido gálico /mL de extrato bruto)	Flavonoides totais (µg de rutina/mL de extrato bruto)	Naringina (µg /mL de extrato bruto)	Catequina (µg/mL de extrato bruto)	Epicatequina (µg/mL de extrato bruto)	Resveratrol (µg/mL de extrato bruto)
Extrato aquoso de folha de videira orgânica	4,38± 9,01	26,08± 0,5	160,22± 0,15	5,73± 0,07	4,60± 0,10	0,003± 0,001

Valores expressos como média ± desvio padrão.

4.2 Estimativa do consumo de ração e de água e do índice de eficiência alimentar

Nossos resultados mostram que os animais diabéticos ingeriram quantidades maiores de ração (Figura 4, $P = 0,001$) e água (Figura 5, $P = 0,003$). No entanto o extrato aquoso de folha de videira orgânica não alterou nenhum desses parâmetros após administração crônica.

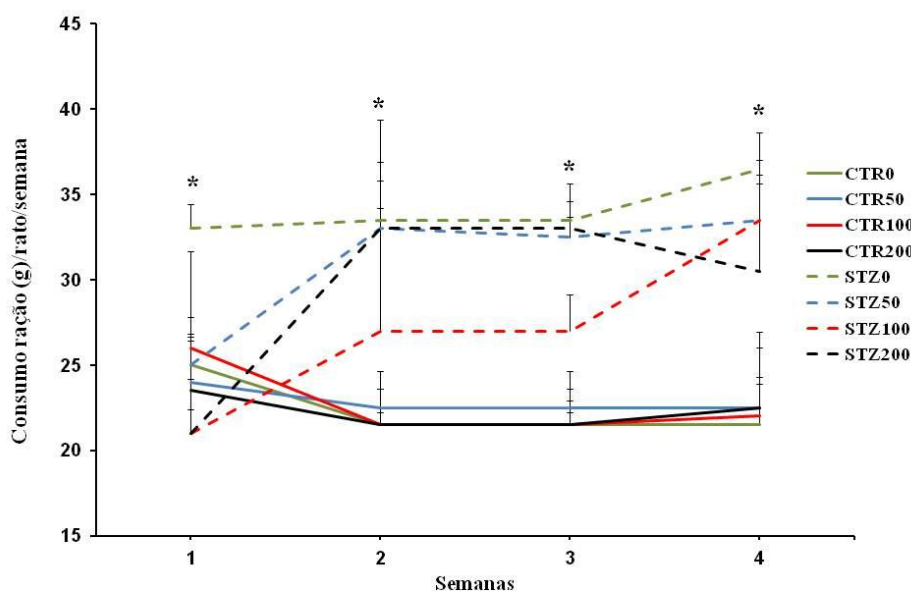


Figura 4. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o consumo semanal de ração (g/rato/semana) nos ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média ± desvio padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de CTR0, $P < 0,001$.

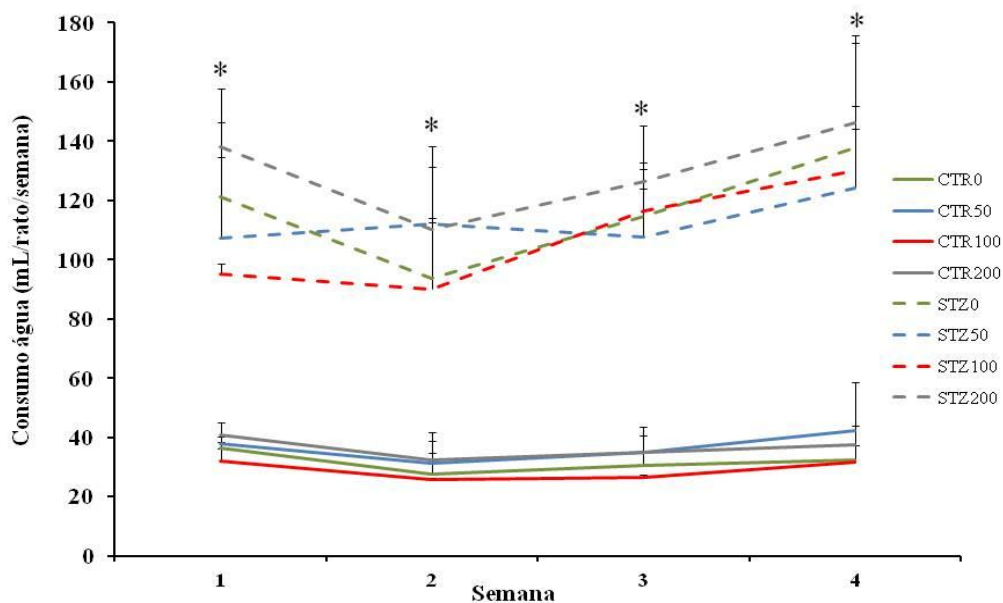


Figura 5. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o consumo de água (mL/rato/semana) nos não diabéticos (CTR) e ratos diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm desvio padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de CTR, $P < 0,05$.

O índice de eficiência alimentar (ração ingerida/variação de peso) total foi menor para os ratos diabéticos ($P < 0,001$) (Figura 6). A administração do extrato de folha de videira não interferiu significativamente sobre esses parâmetros.

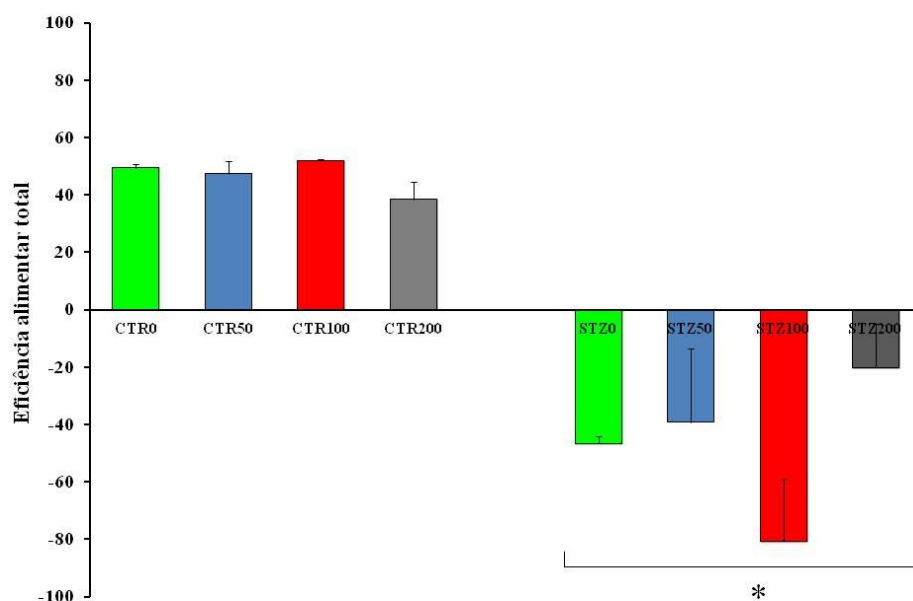


Figura 6. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a eficiência alimentar em ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm desvio padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de CTR, $P < 0,001$.

4.3 Avaliação de medidas ponderais

Ratos diabéticos apresentam menor massa corporal média que ratos não diabéticos ao final do período experimental, não sendo esse parâmetro afetado pela administração do extrato (Figura 7). Observamos que durante o período experimental, os animais diabéticos reduziram o peso corporal enquanto os não diabéticos apresentaram um incremento de peso (Tabela 2). Entretanto, a administração do extrato na dose de 200 mg/kg reduziu significativamente a perda de peso nos animais diabéticos (Figura 7).

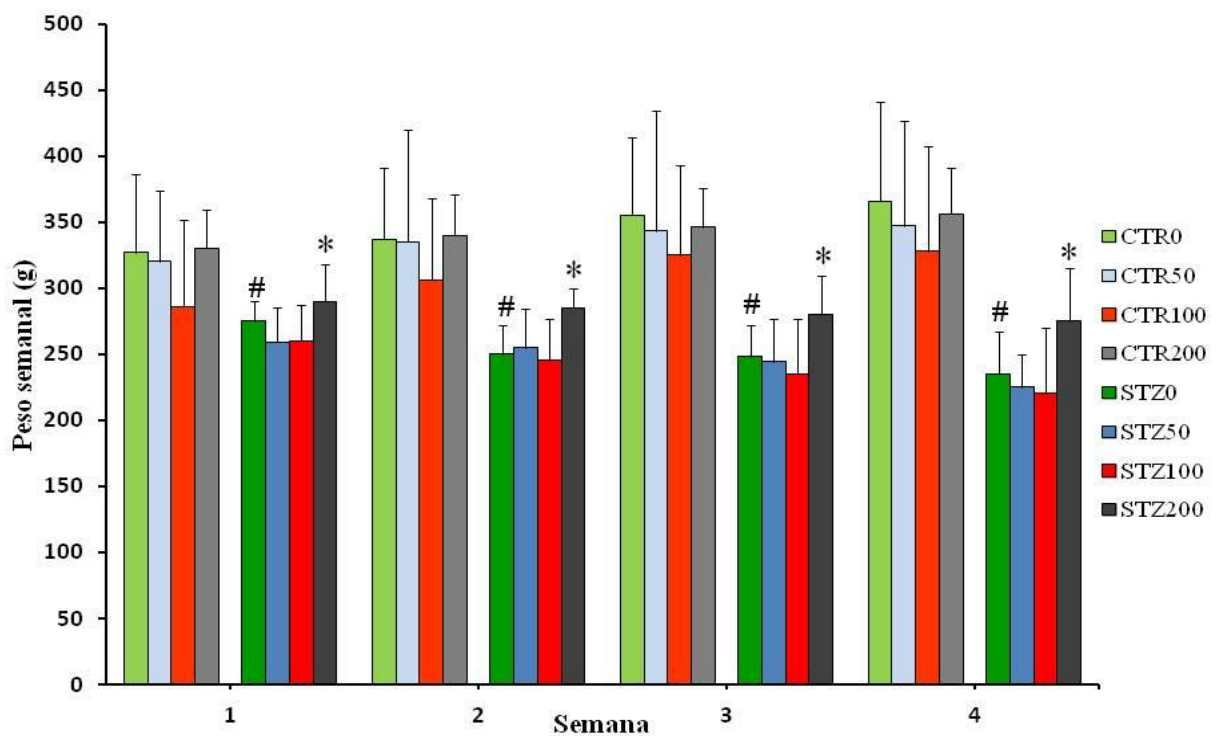


Figura 7. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o peso semanal em ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como mediana e intervalo interquartis; n=10/grupo; Kruskal-walis + Dunnett. # diferente de CTR; * diferente de STZ0, $P < 0,05$.

Em relação ao índice de Lee, detectamos que os animais diabéticos tiveram menores índices quando comparados aos não diabéticos. Este parâmetro também não foi alterado pela administração do extrato (Tabela 2).

Tabela 2. Variação de peso total, percentual e índice de Lee em ratos diabéticos e não diabéticos após 30 dias de administração do extrato da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg.

	Varição de peso total (g)	Varição de peso total (%)	Índice de Lee
CTR 0	37,8 ± 13,4	12,5 ± 5,0	321 ± 7,5
CTR 50	46,7 ± 13,4	14,5 ± 8,0	327 ± 10,4
CTR 100	40,8 ± 11,5	13,3 ± 4,0	329 ± 6,7
CTR 200	33,5 ± 9,3	11,3 ± 3,0	330 ± 10,3
STZ 0	-56,1 ± 30,8*	-20 ± 8,0*	313 ± 10,1*
STZ 50	-30,4 ± 21,6*	-14 ± 9,0*	314 ± 15,0*
STZ 100	-38,9 ± 11,0*	-25 ± 21,0*	304 ± 9,7*
STZ 200	-22,2 ± 22,2*	-8,0 ± 8,0*	315 ± 12,7*
P	< 0,001	< 0,001	< 0,05

Valores em média ± desvio padrão (n=10/grupo). Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni. * diferente de CTR;

4.4 Peso relativo dos tecidos

Em relação ao peso relativo dos tecidos (g de tecido/100g de peso corporal), observamos que a condição de diabete aumentou o peso do fígado ($P < 0,001$), do coração ($P < 0,05$) e do rim ($P < 0,001$) e diminuiu depósitos de gordura epididimal e retroabdominal ($P < 0,001$). A administração do extrato na dose de 200 mg/kg preveniu a redução da gordura epididimal nos animais diabéticos ($P < 0,001$). Entretanto, nenhuma dose de extrato alterou os outros parâmetros avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Peso relativo (g de tecido/100g de peso corporal) de diferentes tecidos de ratos diabéticos e não diabéticos após 30 dias de administração do extrato aquoso da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg.

	Fígado	Coração	Rim	Gordura retroabdominal	Gordura epididimal
CTR 0	2,97 ± 0,57	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,02	1,33 ± 0,52	1,16 ± 0,25
CTR 50	3,00 ± 0,65	0,31 ± 0,04	0,32 ± 0,02	1,37 ± 0,38	1,26 ± 0,29
CTR 100	3,02 ± 0,57	0,30 ± 0,06	0,31 ± 0,30	1,48 ± 0,35	1,38 ± 0,14
CTR 200	3,04 ± 0,69	0,34 ± 0,11	0,34 ± 0,69	1,44 ± 0,22	1,48 ± 0,24#
STZ 0	3,63 ± 0,36*	0,35 ± 0,07*	0,53 ± 0,36*	0,001 ± 0,02*	0,03 ± 0,07*
STZ 50	3,66 ± 0,46*	0,36 ± 0,07*	0,53 ± 0,46*	0,001 ± 0,06*	0,01 ± 0,02*
STZ 100	3,52 ± 0,24*	0,35 ± 0,08*	0,53 ± 0,24*	0,01 ± 0,04*	0,07 ± 0,16*
STZ 200	3,58 ± 0,23*	0,35 ± 0,05*	0,50 ± 0,23*	0,05 ± 0,07*	0,28 ± 0,20*#
P	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,05

Valores em média ± desvio padrão (n=10/grupo). ANOVA- 2 vias + Bonferroni. *Diferente de CTR; # diferente de STZ0, STZ50, CTR0 e CTR50.

4.5 Glicemia de jejum e pós-sobrecarga de glicose

Nossos resultados mostraram que os ratos diabéticos apresentaram maior glicemia de jejum (453,4± 101,51 mg/dL) quando comparados aos não diabéticos (111,8± 9,83 mg/dL) (P < 0,001). O extrato não modificou essas glicemias após tratamento crônico. Após a administração oral da sobrecarga de glicose, os animais diabéticos apresentaram níveis glicêmicos mais elevados em relação aos não diabéticos. Em relação aos diferentes tempos avaliados, observamos que tanto os animais diabéticos quanto os não diabéticos apresentavam glicemias ainda mais

elevadas nos tempos 30 e 60 minutos em relação ao tempos 0 e 120 minutos, conforme figura 8A e 8B.

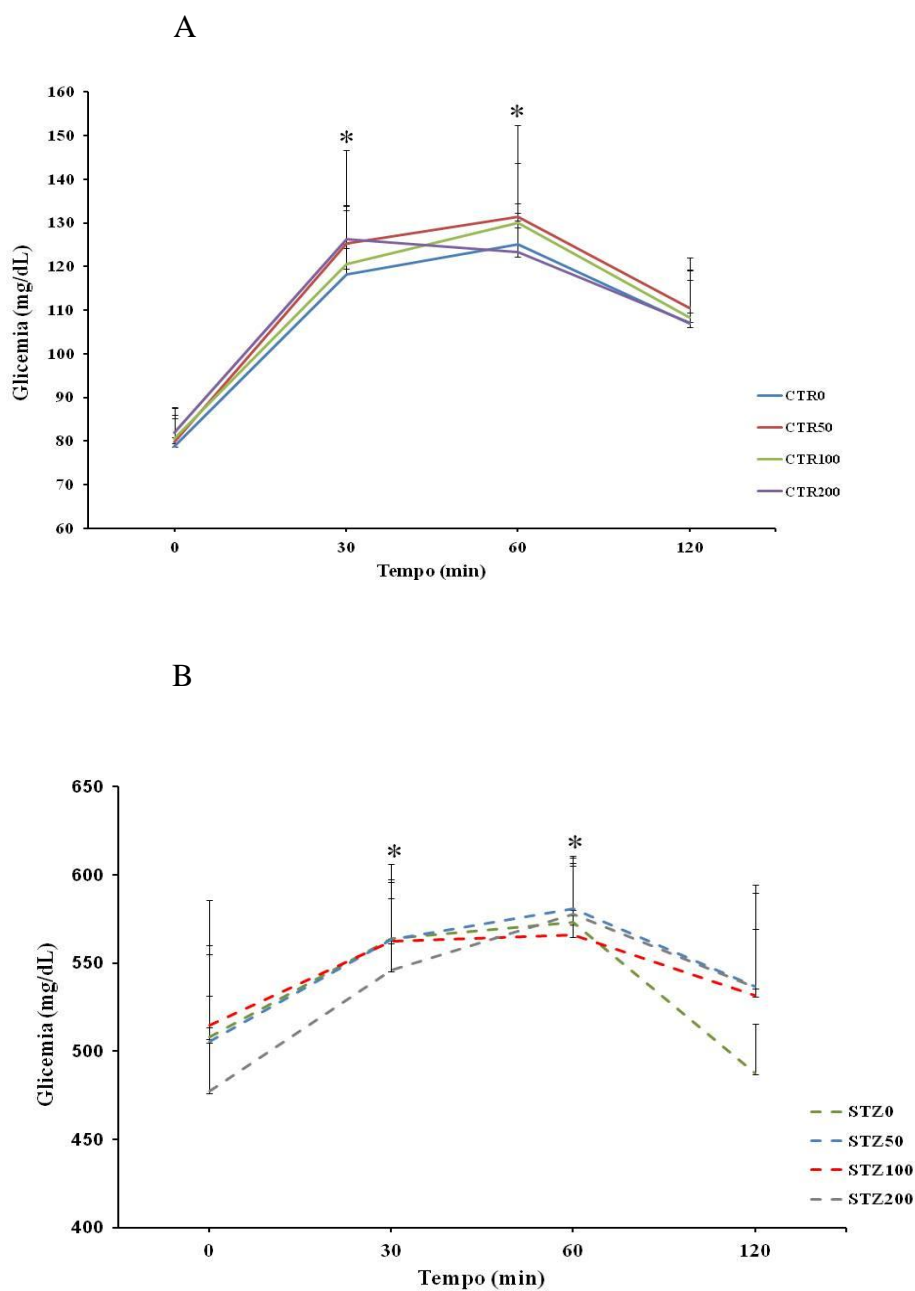


Figura 8. Efeito da administração crônica do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre o teste oral de tolerância a glicose (TOTG) em ratos não diabéticos (A) e diabéticos (B). Valores representados como média \pm desvio padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + $P < 0,001$.

4.6 Parâmetros séricos: lipídicos, hepáticos e renais

Nossos resultados mostraram que os ratos diabéticos apresentaram aumento de triglicerídeos, HDL-C e VLDL-C (Tabela 4). Curiosamente, o tratamento crônico com o extrato de folha de videira na dose de 50 mg/kg reduziu as concentrações de LDL plasmáticos tanto em ratos diabéticos quanto em não diabéticos ($P < 0,05$).

Tabela 4. Concentração de lipídeos e lipoproteínas séricas em ratos diabéticos (STZ) e não diabéticos (CTR) após 30 dias de administração do extrato da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg.

	Triglicerídeos (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)
CTR 0	55,8 ± 26,15	39,0 ± 11,11	16,2 ± 4,81	11,6 ± 3,09	11,1 ± 5,23
CTR 50	51,5 ± 67,48	34,4 ± 6,26	16,5 ± 4,18	8,8 ± 5,74**	16,0 ± 13,49
CTR 100	39,8 ± 25,91	30,2 ± 13,95	15,7 ± 7,19	9,4 ± 4,33	7,9 ± 5,18
CTR 200	35,4 ± 24,88	33,6 ± 9,78	14,8 ± 4,91	11,7 ± 4,76	7,0 ± 4,97
STZ 0	72,8 ± 47,79*	42,4 ± 12,17	19,8 ± 5,93*	12,5 ± 8,65	10,0 ± 4,33*
STZ 50	150,8 ± 109,31*	36,6 ± 14,94	14,8 ± 3,70*	3,7 ± 7,24#	30,1 ± 21,86*
STZ 100	70,2 ± 47,88*	41,2 ± 18,21	19,0 ± 7,96*	8,1 ± 6,70	14,0 ± 9,57*
STZ 200	101 ± 43,22*	51 ± 15,33	26,0 ± 5,91*	11,6 ± 3,09	5,3 ± 8,96*
P	< 0,05	0,071	< 0,05	0,009	0,038

Valores em média ± desvio padrão (n=10/grupo). ANOVA 2 vias + Bonferroni. *Diferente de CTR; # diferente de STZ0; ** diferente de CTR0.

O diabetes também aumentou parâmetros como AST, ALT e ureia em ratos (Tabela 5). Aqui também o tratamento crônico com o extrato de folha de videira nas de 50 e 100 mg/kg reduzem a atividade da AST foi encontrada nos animais diabéticos ($P < 0,05$). Uma redução na concentração de creatinina foi encontrada nos ratos diabéticos e não diabéticos ($P < 0,05$). Essa mesma dose diminuiu a concentração de ureia somente nos animais diabéticos ($P = 0,003$).

Tabela 5. Perfil de função hepática e renal em ratos diabéticos e não diabéticos após 30 dias de administração do extrato da folha de videira orgânica nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg.

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
CTR 0	145,6 [32]	66 ± 29,9	31,0 ± 12,58	0,29± 0,14
CTR 50	129 [67]	57 ± 13,4	29,2 ± 3,70	0,25 ± 0,03*
CTR 100	86 [78]	43 ± 21,6	28,5 ± 7,59	0,28 ± 0,09
CTR 200	115 [99]	44 ± 21,9	27,8± 4,08	0,28 ± 0,07
STZ 0	256 [68]*	203 ± 26*	77,0 ± 25,52*	0,29 ± 0,08
STZ 50	98 [87]*#	115 ± 48,9*	40,7 ± 16,78#	0,20 ± 0,03*
STZ 100	137 [98]*#	94 ± 66,5*	56, 2± 16,39	0,25 ± 0,07
STZ 200	418 [212]*	242 ± 206*	59,8 ± 22,3	0,31 ± 0,09
P	< 0,05	< 0,001	< 0,05	0,010

Valores de AST representados como mediana e + intervalo interquartil. Demais valores representados como média ± desvio padrão (N=10/grupo); ANOVA - 2 vias + Bonferroni. Kruskal-Walis + Dunnet. *Diferente de CTR; #diferente de STZ0.

4.7 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

4.7.1 Fígado

A concentração de TBARS e carbonilas foi mensurada no tecido hepático, para estimar o efeito do extrato de videira sobre a lipoperoxidação e oxidação de proteínas. A condição de diabete aumentou TBARS, evidenciando dano lipídico pela hiperglicemia crônica ($P < 0,001$) (Figura 9). O extrato aquoso de folha de videira orgânica reduziu a concentração de TBARS no fígado dos ratos diabéticos para as três diferentes doses (Figura 6).

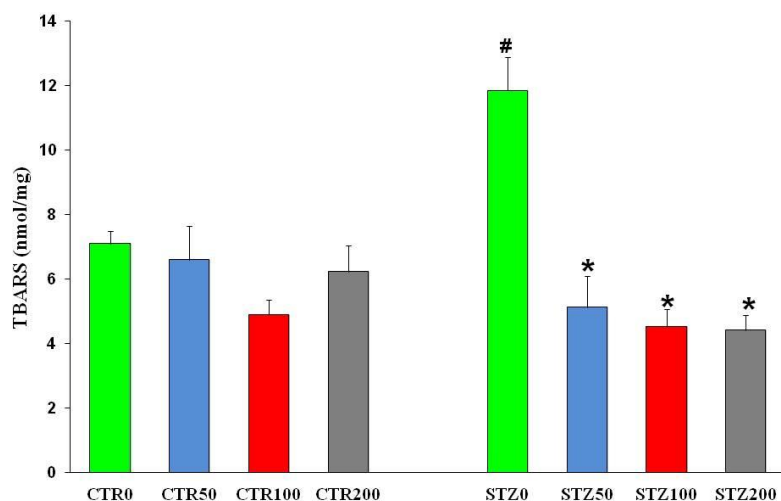


Figura 9. Efeito da administração crônica do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) e tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0, $P < 0,05$; # diferente de CTR0, $P < 0,001$.

A condição de diabetes também aumentou carbonilas proteicas ($P = 0,012$). O extrato nas doses de 100 e 200 mg/kg reduziu esse marcador de dano proteico (Figura 10).

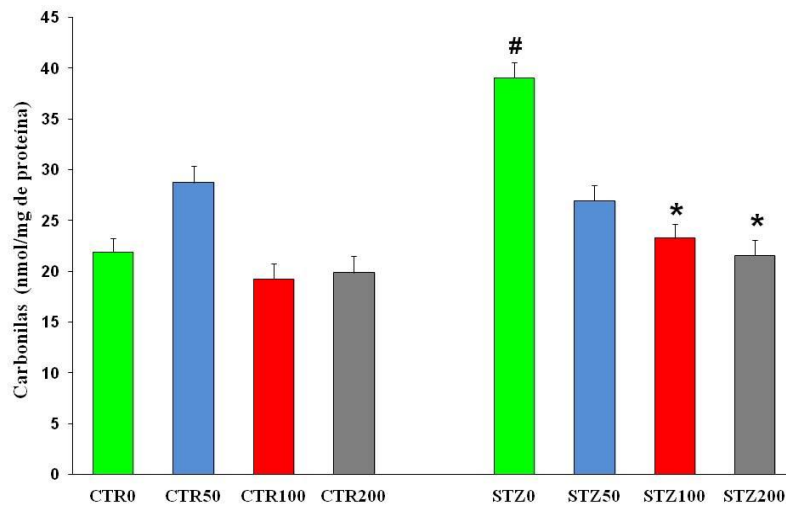


Figura 10. Efeito do tratamento crônico com extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a concentração de carbonilas proteicas no fígado de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) e tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0, $P < 0,05$; # diferente de CTR0, $P < 0,001$.

Nesse mesmo tecido, o diabetes reduziu a concentração de sulfidrilas, evidenciando redução do potencial antioxidante mediado por mecanismo não enzimático ($P < 0,001$) (Figura 11). Para esse parâmetro, todas as doses de extrato de folha de videira mostraram efeito protetor.

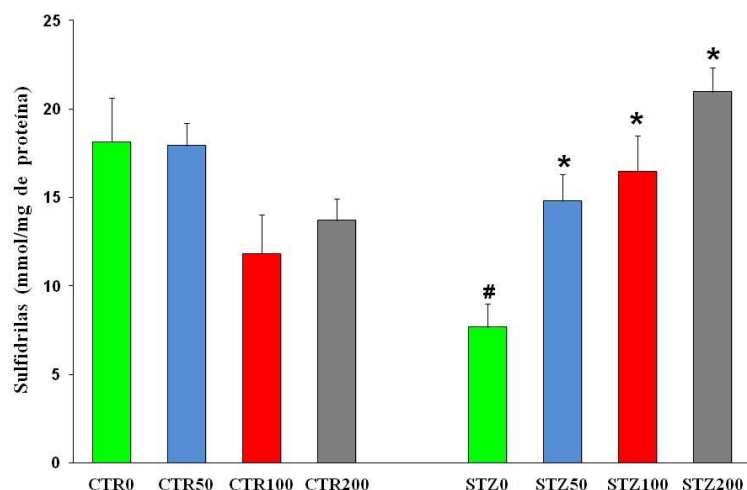
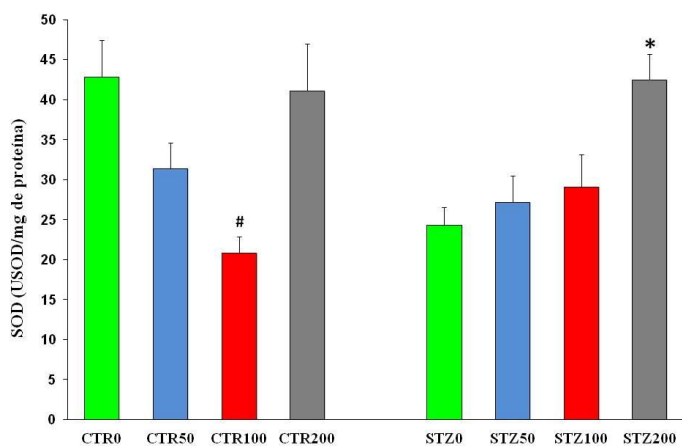


Figura 11. Efeito do tratamento crônico com extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a concentração de sulfidrilas totais no fígado de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) e tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0, $P < 0,05$; # diferente de CTR0, $P < 0,001$.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante enzimático, observamos que a hiperglicemia crônica não afetou atividade da enzima SOD, mas aumentou a atividade da enzima catalase (Figura 12). No entanto, a administração crônica da dose de 100 mg/kg reduziu a atividade da SOD nos animais não diabéticos ($P < 0,05$). Além disso, a maior dose do extrato (200mg/kg) aumentou a atividade da SOD nos ratos diabéticos ($P = 0,05$) (Figura 9A) e a menor dose do extrato (50mg/kg) reduziu a atividade da catalase nos ratos diabéticos ($P = 0,009$) (Figura 9B).

A



B

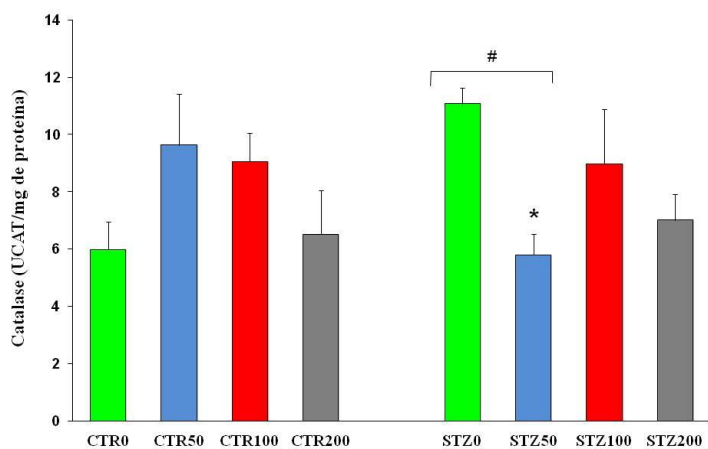


Figura 12. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) (A) e da catalase (CAT) (B) no fígado de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) e tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0 $P < 0,05$; # diferente de CTR0; $P < 0,05$.

4.7.2 Coração

A avaliação da lipoperoxidação no tecido cardíaco revelou que o diabetes aumentou os níveis de TBARS, porém a administração do extrato de folha de videira orgânica, em nenhuma das doses testadas, alterou este parâmetro ($P < 0,001$) (Figura 13).

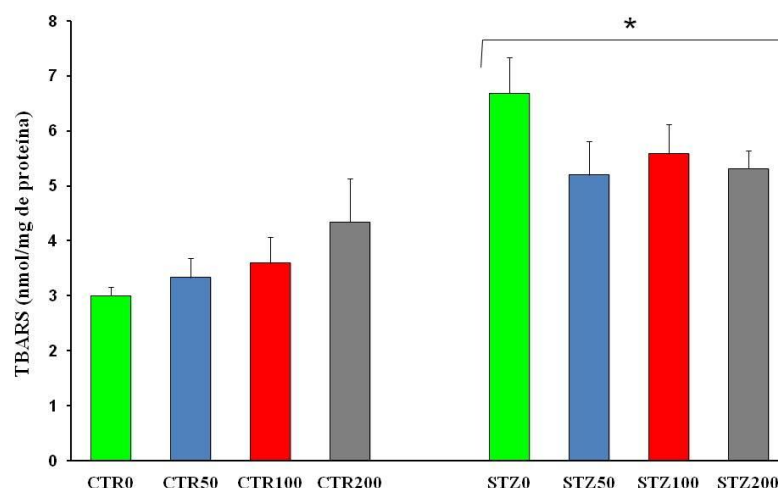


Figura 13. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no coração de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) e tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; $n=10$ /grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de CTR, $P < 0,001$.

Ainda, identificamos um aumento na oxidação de proteínas no tecido cardíaco dos animais diabéticos, evidenciado por altas concentrações de carbonilas. O extrato de folha de videira reduziu significativamente os níveis de carbonilas proteicas nas três diferentes doses ($P < 0,001$) (Figura 14). Entretanto, observamos um aumento na concentração de carbonilas proteicas ocasionado pela dose de 200 mg/kg nos animais não diabéticos ($P < 0,05$) (Figura 14).

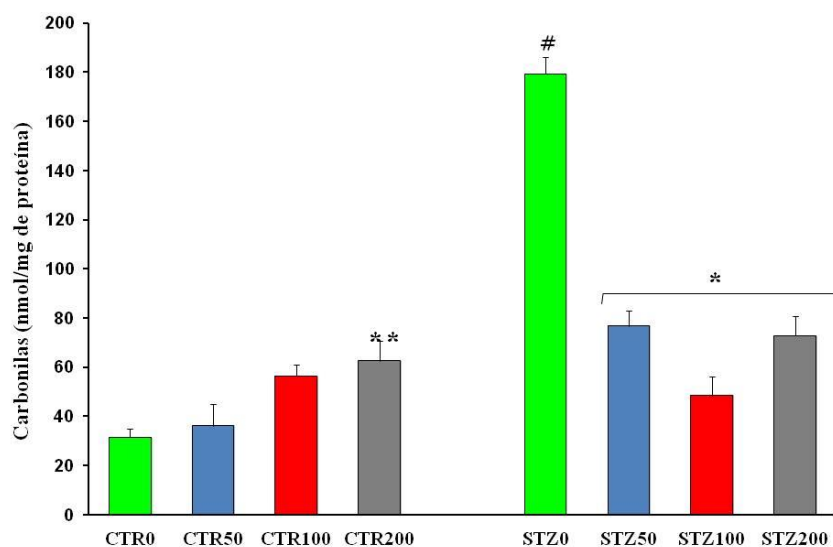


Figura 14. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as carbonilas proteicas no coração de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0, $P < 0,001$; # diferente de CTR0, $P < 0,001$; **diferente de CTR0; $P < 0,05$.

Em relação ao potencial antioxidante não enzimático, detectamos que o diabetes reduziu a concentração de sulfidrilas totais. As doses de 100 e 200mg/kg do extrato aumentaram os níveis de sulfidrilas no tecido cardíaco dos animais diabéticos ($P < 0,001$) (Figura 15).

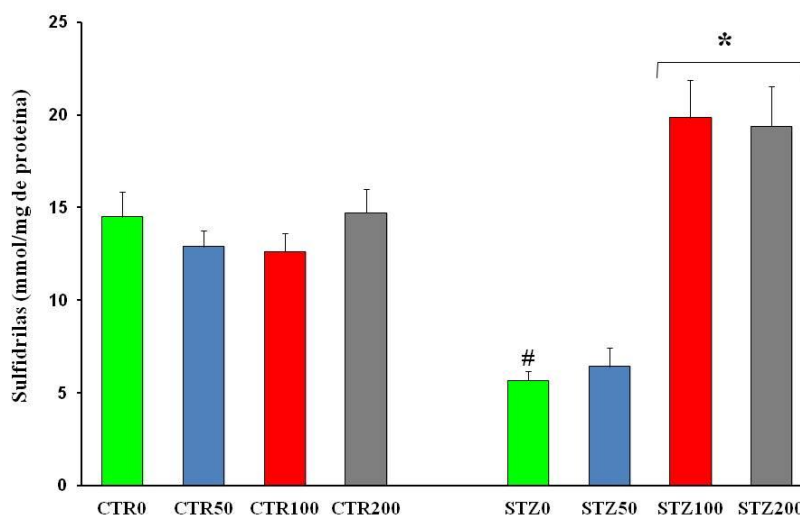
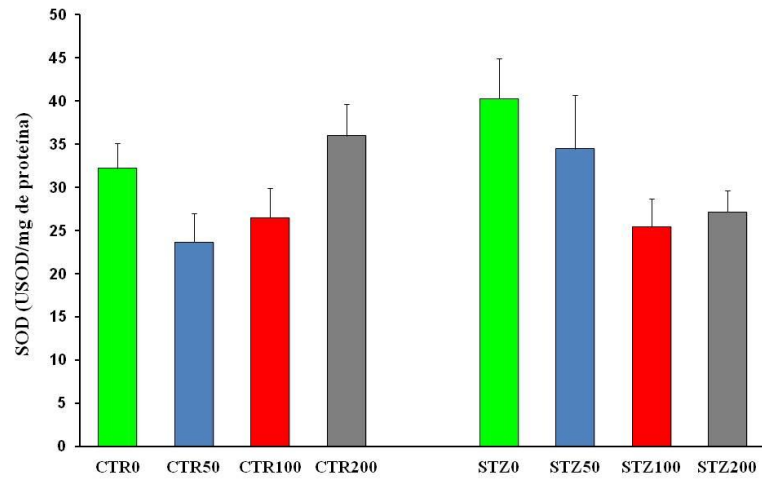


Figura 15. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as sulfidrilas totais no coração de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0 e STZ50, $P < 0,001$; # diferente de CTR, $P < 0,001$.

A avaliação da atividade de enzimas antioxidantes revelou que o diabetes não alterou a SOD ($P < 0,001$) (Figura 16 A), mas aumentou a CAT ($P < 0,001$) (Figura 16 B). A dose de 100 mg/kg reduziu a atividade da CAT nos ratos diabéticos ($P < 0,001$) (Figura 16 B).

A



B

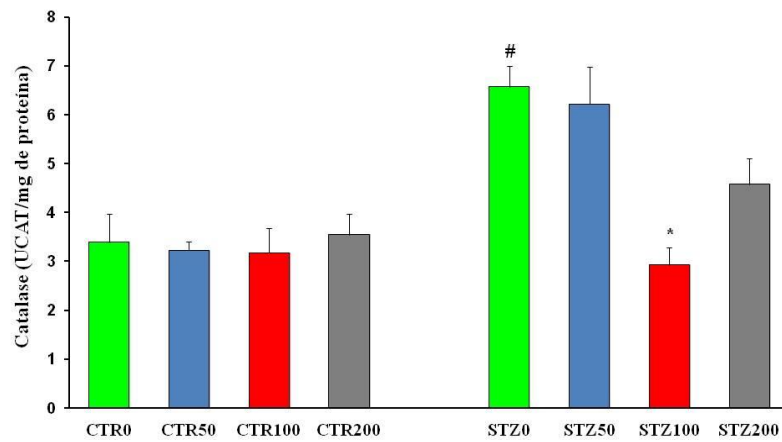


Figura 16. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no coração de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; $n=10$ /grupo, ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente dos STZ, $P < 0,001$; # diferente de CTR0, $P < 0,001$.

4.7.3 Rim

Ao avaliarmos a oxidação lipídica no tecido renal, observamos que não houve alteração nos níveis de TBARS (Figura 17).

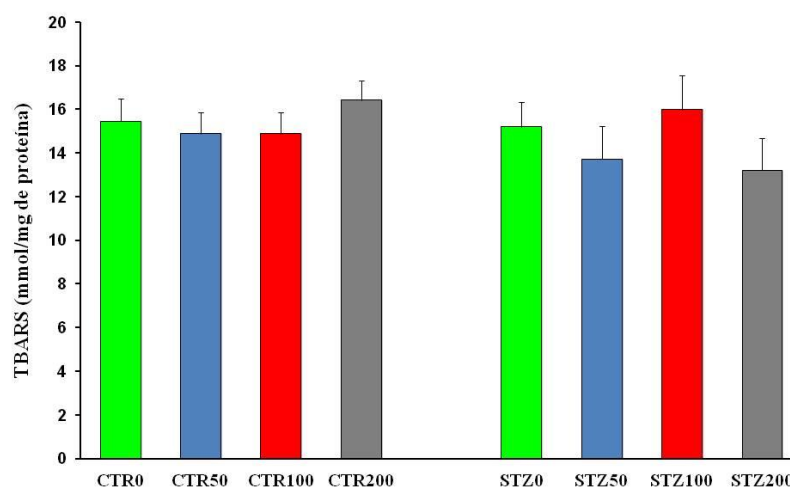


Figura 17. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200 mg/kg, sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no rim de não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias.

Por outro lado, detectamos que o diabetes elevou a concentração de carbonilas proteicas ($P < 0,05$), sendo a administração do extrato de folha de videira orgânica, nas diferentes doses, capaz de reverter este aumento ($P < 0,001$) (figura 18).

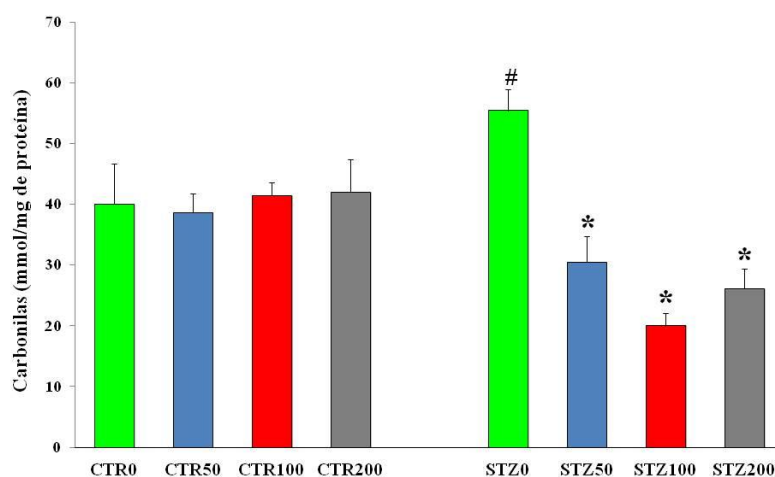


Figura 18. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as carbonilas proteicas no rim de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0, $P < 0,001$; # diferente de CTR0; $P < 0,05$.

Ainda, observamos uma redução dos grupamentos sulfidrila totais no tecido renal dos animais diabéticos ($P < 0,001$) (Figura 19). A dose de 50 mg/kg do extrato de folha de videira orgânica foi capaz de restaurar a capacidade antioxidante endógena nestes animais ($P = 0,002$) (figura 19). Em relação aos animais não diabéticos, observamos uma redução na concentração de sulfidrila totais pela administração das doses de 50 e 100mg/kg ($P < 0,05$) (Figura 19).

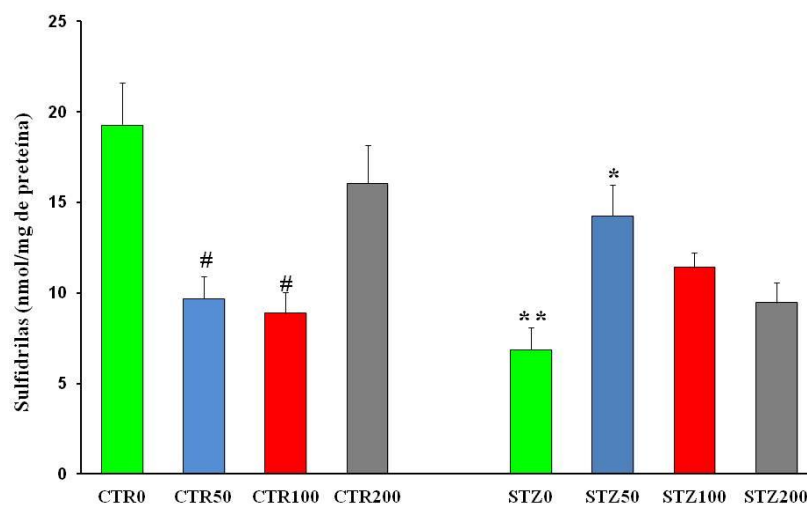


Figura 19. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre as sulfidrilas totais no rim de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm erro padrão; n=10/grupo; ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0, $P < 0,001$; # diferente de CTR0, $P < 0,05$; ** diferente de CTR0, $P < 0,001$.

Em relação ao sistema antioxidante enzimático, nossos resultados mostram que o diabetes aumentou a atividade da SOD ($P = 0,004$) (Figura 20 A), mas não alterou a atividade da CAT (Figura 20 B). Entretanto, o extrato na dose de 50 mg/kg foi capaz de reduzir a atividade da SOD, aumentada pela condição do diabetes ($P = 0,007$) (figura 20 A).

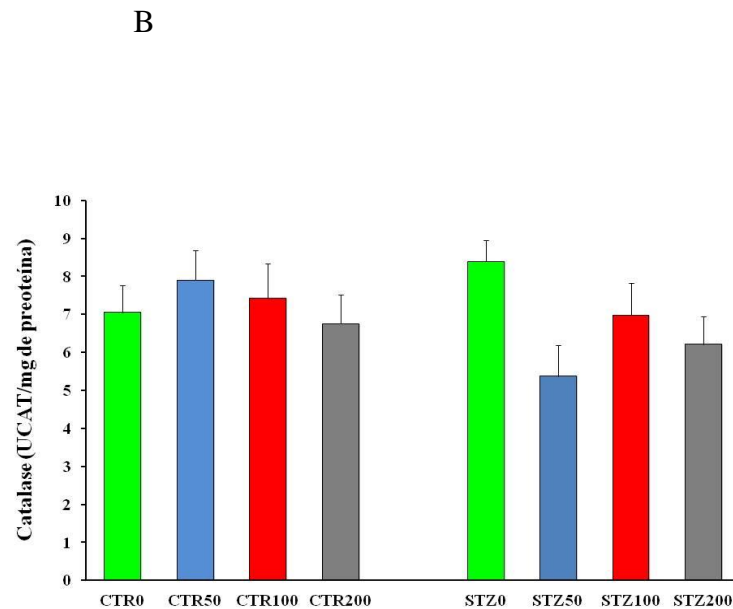
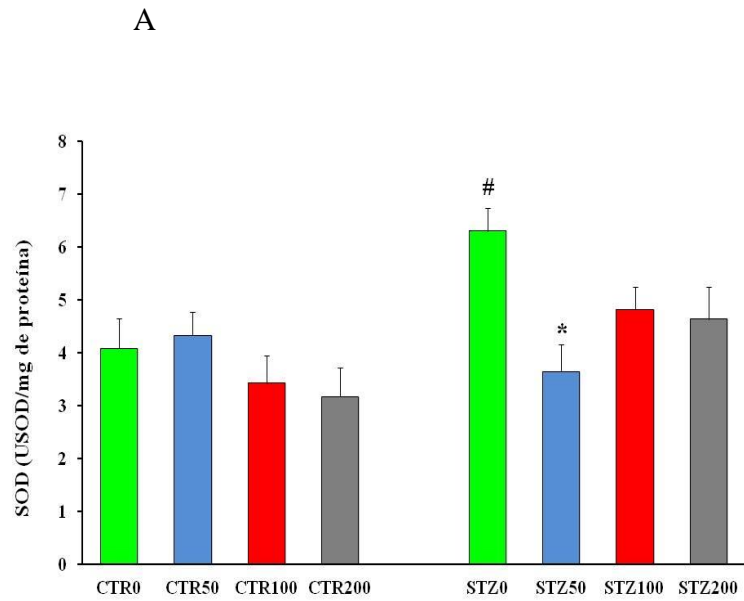


Figura 20. Efeito do extrato aquoso da folha de videira orgânica, nas concentrações de 50, 100 ou 200mg/kg, sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no rim de ratos não diabéticos (CTR) e diabéticos (STZ) tratados por gavagem por 30 dias. Valores representados como média \pm desvio padrão; n=10/grupo, ANOVA-2-vias + Bonferroni. * diferente de STZ0 $P < 0,05$; # diferente de CTR0; $P < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5.1 Composição do extrato aquoso de folha de videira orgânica

A busca por produtos naturais com potencial terapêutico para o tratamento do diabetes e suas comorbidades tem se tornado alvo de muitas pesquisas nos últimos anos. Diante da diversidade de ações benéficas descritas e o potencial terapêutico em diferentes patologias, os polifenóis presentes na uva e seus subprodutos podem ser considerados uma alternativa terapêutica (Rodrigo *et al.*, 2011; Quiñone *et al.*, 2013).

Embora os polifenóis façam parte da composição fitoquímica de uma diversidade de plantas, o padrão qualitativo e quantitativo, bem como a biodisponibilidade dos polifenóis presentes determinará a existência de efeitos farmacológicos (Crozier *et al.*, 2010; Abe 2007). Sendo assim, a quantificação dos constituintes fenólicos pode estimar a qualidade e o potencial terapêutico em folhas de videiras (Schneider *et al.*, 2008).

No presente estudo, quantificamos o conteúdo fenólico total, o teor de flavonoides totais, bem como a concentração de naringina, catequinas, epicatequinas e de resveratrol, do extrato aquoso produzido a partir de folhas de videira provenientes de cultivo orgânico. Sabe-se que os níveis de polifenóis variam grandemente entre cultivares da mesma espécie ou entre diferentes partes da planta (Herrmann 1988). Schneider e colaboradores (2008) encontraram conteúdo fenólico variando entre 4,6 e 18,9 mg/100g e com concentração de flavonoides entre 0,2 e 1,45 mg/100g, evidenciando grande variabilidade dos constituintes fenólicos em folhas de videira (*Vitis vinifera*) cultivadas em diferentes continentes.

O conteúdo fenólico total do extrato aquoso de folhas videira orgânica, determinado neste estudo foi de 4,38 mg/mL de extrato bruto. Dani e colaboradores (2010) encontraram concentração de conteúdo fenólico total de 20,2 mg/mL no extrato etanólico de folhas de videira orgânica. Essa diferença se deve provavelmente ao solvente de extração, bem como o método extrativo utilizado (Simões *et al.*, 1999). O conteúdo fenólico total da pele e da polpa de espécies

de uvas cultivadas no Brasil varia de 1,43 a 2,46 mg/100g e 0,04 a 0,11 mg/100 mg, respectivamente (Santos *et al.*, 2011), evidenciando que dentre os subprodutos da uva, a folha pode ser considerada uma importante fonte de polifenóis.

Os flavonoides e antocianinas têm sido descritos como os compostos fenólicos majoritários encontrados em folhas de videiras (Monagas *et al.*, 2006; Prieur *et al.*, 1994). Nossos resultados mostraram a presença de 26 µg de flavonoides totais, 160 µg de naringina, 5,73 µg de catequinas e 4,6 µg de epicatequinas por mL de extrato bruto analisado. Nós encontramos maiores concentrações de flavonoides totais, bem como de naringina e catequinas, no extrato aquoso de folha de videira orgânica, em comparação aos valores de flavonoides totais (8,95 µg/mL), naringina (não detectado) e catequinas (4,3 µg/mL) encontrados no extrato etanólico elaborado a partir de folhas de videiras cultivadas por método tradicional (Dani *et al.*, 2010), indicando que o cultivo orgânico aumenta a presença desses compostos.

As baixas concentrações de resveratrol (0,003 µg/mL) encontradas no nosso extrato têm relação com o local de síntese e armazenamento deste fitoquímico. Sabe-se que o resveratrol é sintetizado e armazenado principalmente na casca das uvas, sendo encontrado em pequena concentração em outras partes da videira (Bavaresco 2003). Seu conteúdo é mais abundante na casca de uvas roxas da espécie *Vitis vinífera* (de 1,1 a 12,3 mg/100 g) (Bavaresco 2003; Fan *et al.*, 2005). Em vinhos, os valores encontrados variaram desde 0,1 até 5,65 mg/L (Stervbo *et al.*, 2007). Utilizando o método de extração etanólico e por maior tempo de extração, Dani e colaboradores (2010) encontraram concentrações 10 vezes maiores de resveratrol em um extrato de folhas orgânica (0.714 mg/g de extrato bruto) comparadas ao extrato de folhas de cultivo convencional (0.062 mg/g de extrato bruto), sendo essas diferenças atribuídas ao método de cultivo orgânico.

5.2 Parâmetros metabólicos

Embora estudos farmacológicos demonstrem os efeitos benéficos de polifenóis isolados para o diabetes e suas complicações, a administração de medicamentos elaborados a partir de plantas medicinais, contendo diferentes constituintes fitoquímicos, produzem efeitos diferenciados, podendo ser considerados potenciais agentes terapêuticos (Sing *et al.*, 2013; Roghani; Baluchejadmorajad, 2010; Negri 2005). A variação no perfil de compostos fenólicos na uva e seus derivados resultam em diferentes respostas biológicas. A diversidade de constituintes ativos pode exercer efeitos sinérgicos, minimizando os efeitos deletérios ocasionados pela hiperglicemia crônica em indivíduos diabéticos (Abe 2007; Brownlee 2004).

Sabe-se que o diabetes está associado não apenas a alterações glicêmicas, mas também a alterações no metabolismo de lipídeos e proteínas (Devlin 2007; IDF 2013; Giaco, Brownlee 2010; Glesner *et al.*, 2009; Kahn *et al.*, 2009). De fato, o grau de descontrole metabólico está intimamente relacionado com a gravidade das complicações em diabéticos (Kahn *et al.*, 2009).

Nós avaliamos nesse estudo o efeito do extrato aquoso de folhas de videiras, produzidas por cultivo orgânico, sobre parâmetros metabólicos em ratos diabéticos e não diabéticos. Diante da escassez de informações disponíveis, nosso estudo, de caráter exploratório, buscou identificar princípios ativos naturais da folha da videira da espécie *Vitis labrusca*, produzidas por cultivo orgânico, no tratamento do diabetes e de suas comorbidades.

5.2.1 Efeito do extrato aquoso de folhas de videira orgânica sobre a glicemia

Conforme esperado, nossos resultados mostram que o diabetes, induzido pela estreptozotocina, aumentou significativamente a glicemia nos animais. Entretanto, nenhuma das doses do extrato aquoso de folha de videira, administrado cronicamente, apresentou efeito hipoglicemiante. A mesma ausência de resposta foi observada após administração oral de uma sobrecarga de glicose. De fato, o efeito hipoglicemiante de extratos é dependente da espécie e da

concentração dos constituintes ativos da planta, do tipo de extração utilizada, da via de administração, bem como da severidade da hiperglicemia (Grover, Rathi 2000; Negri 2005; Cavalli *et al.*, 2007; Sefi *et al.*, 2010). O único estudo avaliando o efeito de extrato aquoso de folha de videira, de cultivo convencional, da espécie *Vitis vinifera*, sobre a glicemia mostrou efeito hipoglicemiante na dose de 500 mg/kg, após 15 dias de tratamento (Orhan *et al.*, 2006). Naquele estudo, a glicemia induzida pela estreptozotocina não ultrapassava 380 mg/dL enquanto que para os nossos animais, os valores eram superiores a 500 mg/dL. Estudos avaliando o efeito antidiabetogênico do extrato de folhas de *Tinospora cordifolia*, ou de extrato de *Arctium minus*, mostram que ambos reduzem a glicemia somente nos animais que apresentam hiperglicemia de leve a moderada (até 360 mg/dL), sem evidência de efeito em ratos com hiperglicemia severa (> 400 mg/dL) (Grover, Rathi 2000; Negri 2005). Embora especulativo, não descartamos que a severidade do diabetes tenha prejudicado o possível efeito hipoglicemiante nas doses utilizadas neste estudo.

Além disso, o efeito farmacológico é dependente, dentre outras coisas, da biodisponibilidade das substâncias bioativas administradas. Não descartamos que a administração oral do extrato de folha de videira seja insuficiente para detecção do seu efeito antidiabético, uma vez que a biodisponibilidade oral dos polifenóis é de cerca de 10%, em decorrência da polaridade e do tamanho da molécula (Hu 2007). Administração pela via intraperitoneal de um extrato aquoso de *Artemisia campestris*, elaborado a partir de folhas ricas em polifenóis, reduz a hiperglicemia em ratos diabéticos (Sefi *et al.*, 2010).

5.2.2 Efeito do extrato aquoso de folhas de videira orgânica sobre lipídeos

Além de alterar o metabolismo da glicose, o diabetes é capaz de modular o metabolismo lipídico, modificando os depósitos de tecido adiposo por alterar o padrão de gasto energético

(Sefi *et al.*, 2010; Sing *et al.*, 2012; El-Awdan *et al.*, 2013). Isso ocorre, pois o comprometimento energético, resultado do impedimento da conversão de glicose em ATP no meio intracelular, resulta na mobilização de ácidos graxos totais, que são utilizados como substrato metabólico pelas células (Kahn *et al.*, 2009). De fato, em diabéticos, a ausência ou deficiência de insulina ativa a enzima lipase hormônio sensível que estimula a lipólise, ocasionando uma redução maciça dos depósitos de tecido adiposo e significativa perda de peso (Kahn *et al.*, 2009).

Gorduras retroabdominal e epididimal apresentam diferenças na sua mobilização (Ghorbani *et al.*, 2010). Depósitos de gordura retroabdominais, por exemplo, são metabolicamente mais ativos e mais suscetíveis à lipólise basal em função de sua maior vascularização e responsividade a estímulos adrenérgicos, deflagrados durante deficiência de insulina ou jejum (Ghorbani *et al.*, 2010). Nossos resultados mostram que o diabetes reduziu os depósitos de gordura retroabdominal e epididimal; no entanto, o extrato de videira na dose de 200 mg/kg preveniu a perda de gordura epididimal, evidenciando que a mobilização dessa gordura ocorre de modo mais tardio que a retroabdominal. Como esperado, os animais tratados com a dose de 200 mg/kg de extrato apresentaram menor perda de peso em relação aos outros animais diabéticos. Corroborando nossos resultados, a administração de extrato hidroalcolico de folhas de *Cestrum nocturnu*, uma planta rica em flavonoides, ou de extrato de folhas de *Artemisia campestris*, protegem ratos diabéticos contra a redução de peso corporal (Kamboj *et al.*, 2013, Sefi *et al.*, 2012). Nosso estudo se diferencia dos demais por apontar o efeito sobre redução da lipólise e manutenção do tecido adiposo em diabéticos, contribuindo para a redução de ácidos graxos totais, minimizando a ocorrência de dislipidemias, bem como reduzindo o risco de eventos cardiovasculares.

Em diabéticos, a deficiência de insulina aumenta ácidos graxos totais e estimula maior produção de lipoproteínas, gerando dislipidemias (Kahn *et al.*, 2009). Sabe-se que dislipidemias estão diretamente relacionadas à ocorrência de aterosclerose e doença cardiovascular,

comorbidades muito frequentes em indivíduos diabéticos (Kahn *et al.*, 2009; Mooradian, 2009). Nossos resultados mostram que o diabetes elevou as concentrações plasmáticas dos triglicerídeos, HDL-C e VLDL-C, porém nenhuma das doses de extrato administradas foi capaz de reverter estes parâmetros. No entanto, o extrato na dose de 50mg/kg apresentou um efeito hipocolesterolêmico, ao reduzir o LDL-C nos animais diabéticos.

Catequinas isoladas do chá verde ou a associação de extrato de folhas *Pterocarpus marsúpio Roxb* e *Ocimum sanctum Linn* administrados por via oral também mostram efeito redutor do LDL-C em ratos diabéticos (Roghani, Baluchejadmorajad 2010; Singh *et al.*, 2012). Tal efeito foi observado também pela administração de extrato aquoso de *Withania coagulans* uma fruta rica em polifenóis (Sukla *et al.*, 2012). Esses autores mostram que o extrato de *Withania coagulans* aumenta a atividade da enzima acetil-CoA carboxilase (enzima chave da síntese de ácidos graxos) e reduz a atividade da enzima HMG-CoA redutase, enzima limitante para a síntese de colesterol (Sukla *et al.*, 2012). Portanto, o efeito hipocolesterolêmico do extrato aquoso de folha de videira, na dose de 50 mg/kg, pode indicar possível efeito terapêutico. Concentrações elevadas de colesterol no sangue estão correlacionadas com à citotoxicidade lipídica tanto em diabéticos quanto em não diabéticos (Mota, 2003; Sefi *et al.*, 2010).

5.2.3 Efeito do extrato aquoso de folhas de videira orgânica sobre função renal e hepática

Além de avaliarmos parâmetros de glicose e lipídeos séricos, também avaliamos função renal e hepática, com o intuito de investigar possíveis propriedades protetoras do extrato de folha de videira orgânica frente às complicações tardias do diabetes. Em longo prazo, indivíduos diabéticos são acometidos por uma disfunção renal, podendo evoluir até a nefropatia diabética (Yan, *et al.*, 2007). Alterações em marcadores renais como ureia e creatinina, podem predizer a funcionalidade do rim (Almadal, Vilstrup, 1988; Mota, 2003).

Em nosso trabalho, observamos que o extrato na dose de 50 mg/kg reduziu ureia e creatinina nos animais diabéticos, evidenciando um efeito protetor da função renal. Em diabéticos, a hipoinsulinemia diminui síntese proteica e aumenta o catabolismo das proteínas, aumentando a produção hepática de ureia (Kahn *et al.*,2009). Portanto, aumento de ureia no plasma está relacionado ao teor de catabolismo proteico, estado de hidratação (alterado pela hiperglicemia) e comprometimento da função renal (Mota 2003). Outro importante marcador da função renal é a creatinina, um produto da degradação da fosfocreatina muscular que tem um padrão de produção e eliminação relativamente constante (Mota 2003).

Nossos resultados corroboram com estudos anteriores, que demonstraram que a administração de extratos de plantas, ricos em polifenóis melhoram a função renal no diabetes experimental (Lee *et al.*,2009; Sefi *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). A concentração de ureia e creatinina em ratos diabéticos foi reduzida após a administração oral dos polifenóis do extrato metanólico de *Acácia nilotica* e de catequinas isoladas (Omara *et al.*, 2012; Chennasamudram *et al.*, 2012). A hiperglicemia crônica promove oxidação de proteínas glomerulares, ocasionado hipertrofia e deficiência de filtração. Tal dano oxidativo pode ser revertido pelo efeito antioxidante de polifenóis (Lee *et al.*,2009). Em outro trabalho, a administração intraperitoneal de resveratrol, outro polifenol encontrado na uva ou seus subprodutos, reduz creatinina e ureia, protegendo contra o dano renal, ocasionado pela hiperglicemia crônica (Schmatz *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostram que o extrato de folha de videira orgânica, na concentração de 50 mg/kg, apresenta potencial efeito nefroprotetor, possivelmente retardando a progressão da doença renal. Coincidentemente, essa mesma dose reduziu o LDL-C nos ratos diabéticos. Sabe-se que a dislipidemia desempenha um importante papel no desenvolvimento da esclerose glomerular e deterioração da função renal (Sun *et al.*,2002; Kahn *et al.*, 2009). A administração de atorvastatina, um hipolipemiante, melhora consideravelmente a função renal em humanos

(Athiyos *et al.*, 2004). Portanto, não descartamos aqui que a proteção renal produzida pelo extrato esteja também relacionada ao decréscimo nos níveis de colesterol.

O tecido hepático também sofre as consequências do desequilíbrio metabólico provocado pelo diabetes. A hiperglicemia crônica promove dano estrutural ou funcional nos hepatócitos, aumentando a permeabilidade da membrana e elevando a concentração das transaminases ALT e AST no sangue (Dey, Lakshmanan, 2013; Mota 2003). Esse aumento das transaminases também é justificado pelo aumento da gliconeogênese e da cetogênese, resultantes da deficiência de insulina (Singh *et al.*, 2012).

No presente estudo, encontramos um aumento na atividade da ALT e da AST nos animais diabéticos. As doses de 50 e 100 mg/kg de extrato reduziram significativamente a atividade da AST, evidenciando seu efeito hepatoprotetor. Corroborando com nossos resultados, Pari e Suresh (2008) demonstram o efeito hepatoprotetor da administração de extrato alcoólico de folhas de videiras, cultivadas pelo método convencional, após administração crônica de etanol em ratos. Também o extrato butanólico de folhas de videiras apresenta efeito hepatoprotetor pela indução de cirrose por tetracloreto de carbono, evidenciado pela significativa redução na atividade da AST e por parâmetros histológicos (Orhan *et al.*, 2007).

Embora a existência de efeitos benéficos observados por extratos de plantas, deve-se considerar que marcadores de função renal e hepática também podem indicar possíveis efeitos tóxicos desses produtos. Muitos estudos consideram o efeito protetor, utilizando doses elevadas de extratos, sem considerar esses parâmetros (Sefi *et al.*, 2010; Sing *et al.*, 2012; El-Awdan 2013). Nós mostramos aqui que, nas concentrações investigadas, não há dano renal ou hepático pelo uso de extrato de folha de videira orgânica.

Em relação aos demais parâmetros metabólicos avaliados, nós verificamos que a hiperglicemia induzida pela administração de estreptozotocina, aumentou a ingesta alimentar e hídrica, além de reduzir a eficiência alimentar. Além disso, em relação aos parâmetros de

medidas ponderais, ainda encontramos uma redução no índice de massa corporal e no peso relativo da gordura epididimal, bem como aumento no peso relativo do fígado, coração, rim. Entretanto, verificamos que a administração do extrato aquoso de folha de videira orgânica, nas três diferentes doses, não alterou estes parâmetros.

5.3 Efeito do extrato aquoso de folhas de videiras orgânica sobre parâmetros oxidativos no fígado

Indiscutivelmente, inúmeros estudos demonstram as propriedades antioxidantes dos polifenóis da uva e seus subprodutos, porém poucos avaliam o potencial antioxidante da folha da videira (Cardozo *et al.*, 2013; El-Afy *et al.*, 2005; Oliboni *et al.*, 2011). A ação antioxidante dos polifenóis da uva se deve tanto a sua capacidade de sequestrar metais de transição, importantes intermediários na formação de espécies reativas, quanto como o seu potencial varredor (*scavenger*) de radicais totais, inibindo reações oxidativas em cadeia (Ross, Kasum 2003; Fraga *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo desempenha um papel central no desenvolvimento das complicações do diabetes (Giacco, Browlee 2010; Maritim 2003). A hiperglicemia crônica ativa diferentes vias metabólicas que culminam com a superprodução do radical superóxido, que direta ou indiretamente, é capaz de gerar dano a múltiplos órgãos (Dey, Lakshmann 2013; Quiñone *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Browlee 2004; Fadini *et al.*, 2009).

No presente estudo, nós avaliamos o efeito antioxidante do extrato de folhas de videira orgânica no fígado, coração e rim de ratos diabéticos. Em nosso estudo, observamos que o diabetes aumentou a concentração de TBARS e carbonilas e reduziu sulfidrilas no fígado, evidenciando dano lipídico e proteico, bem como uma redução nas defesas antioxidantes. Em diabéticos, o excesso de glicose no fígado promove a auto-oxidação da glicose livre e contribui para a produção de espécies reativas, seguida da carbonilação de proteínas, estresse oxidativo e

dano celular (Dey, Lakshmann 2013). Além disso, distúrbios no metabolismo lipídico, presentes em indivíduos diabéticos, aumentam a lipogênese hepática, resultando em acúmulo e oxidação de lipídeos no hepatócito, produzindo dano hepático relacionado à hiperglicemia (Kahn *et al.*, 2009).

A administração de compostos fenólicos, tais como flavonoides, catequinas, epicatequinas e resveratrol, presentes no extrato de folha da videira, administrado nas doses mais elevadas (100 e 200 mg/kg) foi capaz de reduzir a lipoperoxidação, a carbonilação de proteínas e restaurar os níveis de antioxidantes não enzimáticos no fígado dos ratos diabéticos. Este mesmo padrão antioxidante foi encontrado no fígado de ratos, após administração de extrato alcoólico de folhas de videiras frente ao dano oxidativo provocado pela administração crônica de etanol (Pari, Suresh 2008). Estudos mostram que catequinas e epicatequinas presentes na folha de videira têm efeito inibidor da lipoperoxidação por sua capacidade de eliminação de radicais totais e por sua propriedade de quelar metais de transição (Kravchenko *et al.*, 2003; Fraga *et al.*, 2010). A porção catecol dos polifenóis atua como centros de alta afinidade para íons metálicos, importantes catalisadores de reações oxidativas e indutores de dano a lipídeos (Rodrigo *et al.*, 2011; Perrom, Brumaghin 2010). Outros autores também destacam o efeito hepatoprotetor de polifenóis da uva contra o dano lipídico e proteico em roedores (Chis *et al.*, 2010; Suwannaphet *et al.*, 2010; Orhan *et al.*, 2007).

Avaliando a atividade de enzimas antioxidantes no tecido hepático, observamos que embora o diabetes não tenha alterado a atividade da SOD, o extrato reduziu sua atividade na dose de 100 mg/kg nos animais não diabéticos e aumentou sua atividade na dose de 200 mg/kg nos animais diabéticos. A atividade da CAT, ao contrário, estava aumentada pelo diabetes e o extrato na dose de 50 mg/kg reduziu-a. Resultados referente à atividade das enzimas antioxidantes em indivíduos diabéticos são controversos. Alguns estudos mostram uma redução na atividade da SOD e da CAT em diabéticos, enquanto outros mostram um aumento da atividade dessas

enzimas (Okutan *et al.*, 2005; Sefi *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2013). A redução da atividade pode ser justificada por reações de glicação proteica e inativação enzimática ocasionada pelo ânion superóxido e/ou H₂O₂ que alteram sua estrutura tridimensional, com consequente perda de função (Sefi *et al.*, 2010). Por outro lado, o aumento na atividade enzimática pode ocorrer como tentativa de neutralização frente ao aumento espécies reativas, como de ânion superóxido e/ou H₂O₂ provocado pela glicotoxicidade (Okutan *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, a redução na atividade da SOD pela dose de 100 mg/kg nos animais não diabéticos pode ser justificada pela capacidade neutralizadora de espécies reativas produzida pelos polifenóis do extrato (Ross, Kasum 2003). Ao reagirem como doadores de elétrons, os polifenóis auxiliam o sistema antioxidante endógeno e estabilizam espécies reativas, produzidas em reações fisiológicas, tais como o ânion superóxido, o substrato da SOD, ocasionando uma redução na sua atividade (Cerqueira *et al.*, 2007).

Nos animais diabéticos, a administração do extrato na dose de 200mg/kg aumentou a atividade da SOD, intensificando a resposta antioxidante no tecido hepático. Similarmente, também foi observado por Chis e colaboradores (2010), aumento da atividade da SOD no fígado de ratos diabéticos após administração de extrato de semente de uva, rico em polifenóis. Do mesmo modo, o suco de uva aumenta a atividade da SOD no fígado de ratos (Rodrigues e colaboradores, 2013). Este efeito observado aqui pela administração de extrato de folha de videira pode ser atribuído à presença de polifenóis, uma vez que esses compostos são descritos como citoprotetores e moduladores de enzimas antioxidantes, por aumentarem a expressão de fatores de transcrição como o Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) e suas proteínas quinases regulatórias, intensificando o potencial antioxidante (Palsamy, Subramanian 2011). Consequentemente, a ativação do Nrf2 resulta no aumento da expressão e atividade da SOD, potencializando a resposta enzimática (Murakami, Ohnishi 2012).

Em relação à atividade da CAT, observamos aumento nos animais diabéticos, sendo ela reduzida pela administração de 50 mg/kg do extrato de folha de videira. Sabe-se que a CAT é a enzima que catalisa a quebra de H_2O_2 em água e oxigênio (Halliwell, Gutteridge 1999). Sendo assim, o aumento na atividade desta enzima pode ser parte de um mecanismo fisiológico compensatório, diante da alta disponibilidade intracelular de H_2O_2 em diabéticos (Solomon *et al.*, 2003; Sefi *et al.*, 2010). Já a redução da atividade da CAT pode ser decorrente do efeito antioxidante dos polifenóis do extrato, que atuam como estabilizadores de espécies reativas, como H_2O_2 (Fraga *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2011).

Entretanto, não encontramos aumento na atividade da SOD no fígado dos animais diabéticos, o que sugere que a produção de H_2O_2 intracelular não foi originada majoritariamente pela dismutação do ânion superóxido. Assim, o aumento na atividade da CAT pode ser justificado pelo H_2O_2 proveniente de outras fontes, como por exemplo, produção mitocondrial e/ou pela ação de diferentes isoformas de enzimas NADPH oxidases induzidas pela hiperglicemia crônica (Nauseef 2014; Halliwell, Gutheridge 2007).

Os antioxidantes biologicamente ativos encontrados na folha de videira estabilizam os radicais totais, reduzem o consumo de antioxidantes e poupam a atividade antioxidante endógena, efeitos que podem ser responsáveis pela redução do estresse oxidativo nos animais diabéticos em nosso estudo.

5.3.1 Efeitos do extrato aquoso de folhas de videiras orgânica sobre parâmetros oxidativos no coração

No tecido cardíaco, nossos resultados mostram que a hiperglicemia crônica promove lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e redução nos grupamentos tióis totais em ratos. As doses mais elevadas do extrato (100 e 200 mg/kg) produzem um efeito cardioprotetor nos

animais diabéticos, evidenciado pela redução na concentração de carbonilas, bem como por aumento nos níveis de sulfidrilas totais.

O tecido cardíaco também pode ser afetado pelo diabete (Zhou *et al.*, 2000; Kamalesh 2007). Nestes indivíduos a lesão miocárdica é decorrente da glicação de proteínas intersticiais e do aumento de estresse oxidativo, levando a apoptose e necrose dos cardiomiócitos (Zhou *et al.*, 2000; Kamalesh 2007). O comprometimento da função cardíaca ocorre devido a uma redução na complacência e na contratilidade do miocárdio, causada por reduções na liberação e recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático levando à cardiomiopatia diabética (Mizushige *et al.*, 2000; Cesário *et al.*, 2006).

O tecido cardíaco também pode ser afetado pelo aumento de ácidos graxos circulantes em diabéticos, tornando-o mais susceptível à oxidação especialmente porque o miocárdio, pelas suas características fisiológicas, passa a utilizar ácidos graxos como principal substrato energético (Mizushige *et al.*, 2000; Cesário *et al.*, 2006; Kamalesh 2007). Essa alteração metabólica provoca o acúmulo de lipídeos no meio intracelular, promovendo lipoperoxidação e dano (Kamalesh 2007). Além disso, o aumento do LDL-C em diabéticos está associado ao aumento da expressão de moléculas de adesão e indução de citocinas pró-inflamatórias, ações que contribuem para a fisiopatologia da aterosclerose e da doença cardiovascular (Stephens *et al.*, 2009).

Nossos achados estão de acordo com resultados obtidos por outros autores. Neste contexto, Oliboni e colaboradores (2011) descrevem os efeitos cardioprotetores do extrato folha de videira sobre a oxidação de proteínas e lipídios induzida por H₂O₂ no coração de ratos, destacando a atividade antioxidante superior da folha de videira proveniente de cultivo orgânico. Outro trabalho descreve que o pré-tratamento com extrato aquoso de folha de curry (*Murraya koenigii*) reduz o conteúdo de carbonilas oxidadas bem como aumenta as defesas antioxidantes não enzimáticas no coração de ratos, após o dano oxidativo provocado pela

administração de cloreto de cádmio (Mitra *et al.*, 2012). Em outro trabalho, a administração intraperitoneal do extrato elaborado a partir de semente e casca de uva protege contra a lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, bem como reduz a concentração de H₂O₂ no coração de ratos após o tratamento com o quimioterápico doxorrubicina (Mokni *et al.*, 2012).

Surpreendentemente, a administração da dose de 200 mg/kg aumentou a oxidação de proteínas no tecido cardíaco de animais não diabéticos, evidenciando um possível efeito pró-oxidante. Fitoquímicos naturais, como os polifenóis, quando administrado em altas concentrações pode modificar o status redox celular danificando proteínas intracelulares (Babisch *et al.*, 2011). Entretanto mais estudos são necessários para elucidar tal efeito.

Além de aumentar a concentração de espécies reativas, a hiperglicemia também altera a atividade das enzimas antioxidantes no coração (Rauscher *et al.*, 2001; Maritim *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a avaliação da atividade de enzimas antioxidantes revelou que o diabetes não alterou a SOD, mas aumentou a atividade da CAT, à semelhança do observado no tecido hepático. Estudos mostram que a atividade da SOD também pode ser modulada pela concentração intracelular de H₂O₂. Csonka e colaboradores (2000) mostram que a administração de H₂O₂ inibe a expressão e a atividade da SOD e aumenta a atividade da CAT no coração de ratos espontaneamente hipertensos. Em humanos a atividade da SOD também pode ser inativada por aumento na concentração intracelular de H₂O₂ (Sinet, Garber 1981).

Um aumento na atividade da CAT no coração provocado pelo diabetes, também foi encontrado por outros autores (Kaul *et al.*, 1995; Rauscher *et al.*, 2001; Maritim *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2013). A elevada atividade da CAT nos cardiomiócitos reflete a estratégia do sistema antioxidante para proteger o coração contra o dano provocado pelo aumento de espécies reativas nos animais diabéticos, entretanto o limiar de proteção é dependente do equilíbrio entre as demais enzimas antioxidantes (Kumar *et al.*, 2013).

Em nosso trabalho, a administração da dose de 100 mg/kg do extrato de videira reduziu a atividade da CAT nos ratos diabéticos. Essa redução da atividade da CAT pode ser um reflexo da capacidade de neutralização de espécies reativas, como o H₂O₂, pelos polifenóis do extrato de folha de videira no coração dos ratos diabéticos (Gleisner *et al.*, 2007; Leifert, Abeywardena 2008; Quiñone *et al.*, 2013). Corroborando nossos resultados, outro trabalho ressalta que administração oral do extrato de chá verde, rico em polifenóis, reduz a atividade da CAT no tecido cardíaco de ratos, anteriormente elevada pela hiperglicemia crônica (Babu *et al.*, 2006).

Os benefícios da administração de extrato de folha de videira orgânica, rico em polifenóis, fitoquímicos bioativos, sobre o tecido cardíaco de indivíduos diabéticos podem ir além de suas propriedades antioxidantes, uma vez que esses constituintes também apresentam efeito vasodilatador, antitrombótico, anti-inflamatório, hipolipemiante e antiaterogênicos (Quiñones *et al.*, 2013).

5.3.2 Efeito do extrato aquoso de folhas de videiras orgânica sobre parâmetros oxidativos no rim

Aqui, detectamos que o diabetes não alterou a lipoperoxidação, aumentou a carbonilação de proteínas e reduziu a concentração de antioxidantes não enzimáticos (sulfidrilas totais) no rim de ratos. As três diferentes doses de extrato reverteram a carbonilação de proteínas induzida pelo diabetes, enquanto apenas a dose de 50 mg/kg restaurou a concentração de sulfidrilas no rim dos animais diabéticos.

Uma perda progressiva da função renal tem sido claramente demonstrada em doentes diabéticos, correlacionando-se com um aumento nos níveis circulantes de AGEs e aumento de estresse oxidativo (Sefi *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013). Nestes indivíduos níveis elevados de ROS, seguido da oxidação de proteínas, provocam esclerose glomerular e fibrose túbulo intersticial,

bem como dano ao DNA e apoptose, gerando lesões renais que podem evoluir até a nefropatia diabética (Han *et al.*, 2008 Sun *et al.*, 2013).

Han e colaboradores (2008) ressaltam que a combinação de estratégias que diminuam a produção e facilitem a remoção das espécies reativas podem prevenir o desenvolvimento e a progressão de nefropatia diabética. Neste contexto, há relatos que fitoquímicos bioativos presentes na folha de videira, possuem uma notável capacidade antioxidante tanto *in vitro*, como *in vivo*. Oliboni e colaboradores (2009) mostram o efeito antioxidante dos polifenóis da folha da videira *in vitro*, relacionado à capacidade de inibição da oxidação provocada pelo radical DPPH e degradação da desoxirribose.

Em nosso estudo, observamos que administração dos polifenóis presentes na folha da videira reduziu a oxidação de proteínas e aumentou o potencial antioxidante não enzimático também no tecido renal de ratos diabéticos. Corroborando nossos resultados, a administração dos polifenóis do extrato de *Artemisia campestris* reduz a oxidação de proteínas e aumenta as defesas antioxidantes não enzimáticas no rim de ratos diabéticos (Sefi *et al.*, 2012). Outros estudos mostram que tanto a administração oral de extrato de videira, quanto de extrato de semente de uva reduzem a lipoperoxidação, bem como aumentam o potencial antioxidante enzimático e não enzimático no tecido renal de ratos diabéticos (Pari, Suresh 2008; Mansouri *et al.*, 2011). A administração intraperitoneal de resveratrol, outro polifenol encontrado na uva ou seus subprodutos, restaura os níveis dos antioxidantes não enzimáticos no rim de ratos diabéticos, reduzindo a disponibilidade de espécies reativas e melhorando o status antioxidante neste tecido (Schmatz *et al.*, 2012). A melhora no perfil antioxidante produzido pelos polifenóis pode ser atribuído, em parte, à estimulação da atividade da enzima glutamylcisteína sintetase, uma enzima chave da síntese de glutathione, considerada o antioxidante não enzimático mais importante, devido à presença do seu grupamento tiol (Rodrigo *et al.*, 2011; Moskaug *et al.*, 2005).

Curiosamente, a administração do extrato nas doses de 50 e 100mg/kg reduziu o potencial antioxidante não enzimático nos animais não diabéticos. Entretanto, tal efeito parece não ter sido prejudicial, pois ao avaliarmos os parâmetros de dano tecidual (TBARS e carbonilas), observamos que não houve dano lipídico ou proteico no tecido renal destes animais.

Em relação ao sistema antioxidante enzimático, observamos que no rim, a hiperglicemia crônica aumentou parcialmente a atividade das enzimas antioxidantes, refletindo o mesmo padrão de resposta demonstrado pelo tecido hepático e cardíaco.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sefi e colaboradores (2012) e Lymaie e colaboradores (2003). Por outro lado, outros estudos diferem dos nossos resultados mostrando uma redução na atividade das enzimas antioxidantes no rim de animais diabéticos (Orhan *et al.*, 2006; Schmatz *et al.*, 2012). Estas diferenças na atividade das enzimas podem ser atribuídas à dose da substância diabetogênica administrada, à gravidade do estado diabético e do estresse oxidativo, bem como ao tempo de exposição à hiperglicemia (Maritim *et al.*, 2003; Sefi *et al.*, 2012).

Assim, encontramos um aumento na atividade da superóxido dismutase, sendo a administração do extrato na dose de 50 mg/kg capaz de reduzir esta atividade. Entretanto, não houve alteração na atividade da catalase. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Strother e colaboradores (2001) que também encontraram aumento na atividade da SOD no rim de ratos após trinta dias de indução do diabete. O trabalho de Sefi e colaboradores (2012) descreve que o aumento na atividade da SOD no tecido renal de ratos diabéticos foi reduzido em níveis fisiológicos pela administração de um extrato rico em polifenóis. Em outro trabalho, a redução na atividade da SOD no tecido renal de ratos diabéticos ocorre após administração oral dos polifenóis presentes no extrato aquoso de Ginkgo biloba (Welt *et al.*, 2007).

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados em nosso estudo, observamos que a administração dos polifenóis do extrato de folhas de videira orgânica, especialmente na

doses de 50 e 100 mg/kg, apresenta atividade antioxidante no tecido hepático, cardíaco e renal de ratos diabéticos, reduzindo a lipoperoxidação, oxidação de proteínas, bem como aumentando o potencial antioxidante não enzimático. Além disso, nosso tratamento é capaz de parcialmente restabelecer a níveis fisiológicos a atividade enzimática da superóxido dismutase e da catalase.

6. Considerações finais

De fato, nossos resultados são consistentes e se assemelham aos resultados apresentados por outros autores, que comprovam a coexistência de distúrbios metabólicos e estresse oxidativo na fisiopatologia do diabete (Gleissner *et al.*, 2007; Giacco, Browlee 2010; Kahn *et al.*, 2009; Quiñone *et al.*, 2013; Sefi *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013).

Conforme já mencionado, além do desbalanço metabólico, mecanismos de estresse oxidativo estão relacionados ao desenvolvimento das complicações no diabete. O tratamento com insulina ou outros fármacos antidiabéticos produzem um estado glicêmico mais estável, porém não conseguem restaurar completamente o equilíbrio oxidante (Kamalesh 2007; Giacco, Browlee 2010; Singh *et al.*, 2012; Dey, Lakshmann 2013). Assim, mesmo que mais tardiamente, indivíduos diabéticos com bom controle glicêmico também desenvolverão alguma complicação inerente ao diabete (Kahn *et al.*, 2009). Portanto, os tratamentos do diabete devem abordar estratégias que reduzam a concentração de espécies reativas e restaurem o sistema antioxidante, além de exercer controle glicêmico.

Em diabéticos, a maior parte dos antioxidantes naturais administrados não consegue atingir a glicorregulação plasmática (Maritim *et al.*, 2003). Em nosso estudo, administração dos polifenóis presentes no extrato aquoso de folhas de videira orgânica não teve efeito hipoglicemiante, mas apresentou potencial efeito hipolipemiante, bem como uma importante atividade antioxidante, protegendo o fígado, o coração e o rim de ratos contra o dano oxidativo provocado pela hiperglicemia crônica.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, concluímos que a ação sinérgica dos diferentes polifenóis do extrato aquoso de folhas de videira orgânica modula mecanismos metabólicos e apresenta potencial terapêutico nos animais diabéticos. A administração do extrato protegeu contra a perda de peso e preservou o depósito de tecido adiposo, bem como promoveu efeito hipocolesterolêmico, antioxidante, hepatoprotetor, cardioprotetor e nefroprotetor. Portanto, o extrato poderia ser usado como um tratamento coadjuvante à terapia hipoglicemiante na prevenção das comorbidades associadas ao diabetes.

7. Perspectivas

Embora nossos resultados mostrem o efeito protetor do extrato de videira orgânica sobre parâmetros metabólicos e sobre as espécies reativas, outros estudos são necessários para investigar os mecanismos de sinalização intracelular e o efeito do extrato de folha de videira sobre a expressão de proteínas antioxidantes. Também não descartamos que o extrato de videira apresente propriedades hipoglicemiantes em um modelo de diabetes tipo 2, uma vez que um menor comprometimento das células β -pancreáticas, produtoras de insulina, e hiperglicemia menos severa permitam evidenciar esse efeito, além do efeito antioxidante. Assim, no futuro, poderiam ser avaliados os seguintes parâmetros:

- efeito hipoglicemiante do extrato aquoso de folha de videira orgânica em um modelo animal de diabetes tipo 2;
- concentração de H_2O_2 no tecido hepático, cardíaco e renal;
- atividade da enzima glutathione peroxidase;
- atividade da enzima HMG-coA redutase;
- alterações histológicas dos tecidos hepático, cardíaco e renal;
- expressão de enzimas antioxidantes;

- efeito do extrato de folha de videira orgânica sobre a regulação do Nrf2/Keap1 na resposta antioxidante;

8. Referências

Abe, T.L., Mota, R.V., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* *Ciência e Tecnologia Alimentos* 27(2):394-400 2007.

ADA. American Diabetes Association. Disponível: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/recently-diagnosed/living-with-type-1-diabetes.html>. Acesso em: 16/10/2013.

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105:121-126, 1984.

Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 302:141–145, 2001.

Almadal, H. Vilstrup, Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea-N synthesis in experimental diabetes in rats, *Diabetes* 31:114–118, 1988.

Asakawa, A., Toyoshima, M., Inoue, K., Koizume, A. Ins2Akita mice exhibit hyperphagia and anxiety behavior via the melanocortin system. *International Journal of Molecular Medicine* 19: 649-652, 2007.

Athyros, V. G., Mikhailidis, D. P., Papageorgiou, A. A., Symeonidis, A. N., Pehlivanidis, A. N., Bouloukos, V. I., & Elisaf, M. The effect of statins versus untreated dyslipidaemia on renal function in patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Greek atorvastatin and coronary heart disease evaluation (GREACE) study. *Journal of Clinical Pathology*, 57(7):728–734, 2004.

Babich, H., Schuck, A.G., Weisburg, J.H, Zuckerbraun H.L. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of Toxicology*, 1: 1-12, 2011.

Babu, P.V.A., Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 162(21):114-120, 2006.

- Bailey, C.J. Renal Glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes, *Trends of Pharmacological Science* 32(2):63-71, 2011.
- Bannister, J.V., Calabrese, L. Assay for SOD. *Methods of Biochemical Analysis* 32:279-312, 1987.
- Bavaresco, L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 29(6):1881-187, 2003.
- Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal Endocrinology*, 40:527-8, 1968.
- Bertoluci, M.C., CE, G.V.Silva, Punães, M.K. Disfunção Endotelial no Diabetes Melito Tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 52:848-849, 2008.
- Boulton, R.B.; Singleton, V. L.; Bisson, L.F. & Kunkee, R.E. (1995). *Principles and practices of winemaking*. International Thomson Publishing. 603, 1995.
- Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820, 2001.
- Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54(6):1615-25, 2004.
- Brunetto, G., Caretta, C.A., Kaminsk, J., De Melo, G.W., Giroto, E., Trentin, E.E., Lourenzi, C.G., Vieira, R.C.B., Gatiboni, L.C. Produção e composição química da uva de videiras Cabernet Sauvignon submetidas à adubação nitrogenada. *Ciência Rural*, 39(7):2035-2041, 2009.
- Caletti G., Olguins D.B., Pedrollo E.F., Barros H.M., Gomez R. Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. *Amino Acids*, 43(4):1525-33, 2012.
- Cardozo, M.G., Medeiros, N., Lacerda, D.S., De Almeida, D.C., Henriques, J.A.P., Dani, C., Funchal, C. Effect of Chronic Treatment with Conventional and Organic Purple Grape Juices (*Vitis labrusca*) on Rats Fed with High-Fat Diet. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 33(8):1123-33, 2013.

Cerqueira, F.M., De Medeiros, M.H.G., Ohara, A. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. *Química Nova*, 30(2):441-449, 2007.

Chennasamudram, S.P., Kudugunti, S., Boreddy, P.R., Moridani, M.Y., Vasylyeva, T.L. Renoprotective effects of (+)-catechin in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Nutrition Research* 35(5):347-356, 2012.

Chilelli, N.C., Burlina, S., Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A “glycoxidation-centric” point of view. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 1-7, 2013.

Chis, I.C., Ungureanu, M.I., Marton, A., Simedrea, R., Muresan, A., Postescu, I., Decce, N. Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetes & Vascular Disease Research* 6(3):200–204, 2009.

CONSEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA 2013. http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226746.pdf. Acesso em 11/07/2013.

Crozier, A., Rio, D.D., Clifford, M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine* 31:446–467, 2010.

Csonka, C., Pataki, T., Kovacs, P., Muller, S.L., Schroeter, M.L., Tosaki, A., Blasig, I. Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(7):612-619, 2000.

Cusi, K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 13:546-563, 2009.

Dani, C., Oliboni, L.S., Agostini, F., Funchal, C. Serafini, L., Henriques, J.A., Salvador, M. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro* 24:148–153, 2010.

Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., Henriques, J.A.P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food and Chemical Toxicology*, 45:2574–2580, 2007.

Dani, C., Pasquali, M.A.B., Oliveira, M.R., Umezu, F.M., Salvador, M., Henriques, J.A.P., Moreira, M.R. Protective Effects of Purple Grape Juice on Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Stress in Brains of Adult Wistar Rats. *Journal of medicinal Food*, 11:55–61, 2008.

Dey, A., Lakshmanan, J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food Fuction* 4:118-1184, 2013.

Dhingra, R., Ramachandran, S.V. Diabetes and the risk of heart failure. *Heart Failure Clinics*, 8(1):125-133, 2012.

Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A., Plant polyphenols: are they the new magic bullet *Proceedings of the Nutrition Society*, 62:599–603, 2003.

ECOVIDA. Rede Ecovida de Agroecologia. Disponível em: [http://www.ecovida.org.br /category /a-rede/certificacao/](http://www.ecovida.org.br/category/a-rede/certificacao/). Acesso em: 25/10/2013.

Ector, B.J., Magee, J.B., Hegwood, C.P., Coign, M.J. Resveratrol concentration in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 47(1):57-62.

El-Alfy, A.T., Ahmed, A.E., Fatani, A.J. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacological Research* 52:264-270, 2005.

El-Awdan, S.A., Jaleel, G.A.A., Saleh, D.O. Grape seed extract attenuates hyperglycaemia-induced in rats by streptozotocin. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 1:1-7, 2013.

EMBRAPA 2013. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br /FontesHTML /Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/index.htm>. Acesso em: 8/10/2013.

Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S., Sirajudeen, K.N., Sallet, M.D., Gurtu, S. Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Annales d'Endocrinologie*, 71:291–296, 2010.

Fadini, G.P., Kreuzendberg, S.P., Tiengo, A., Avogaro, A. Why to screen heart disease in diabetes. *Atherosclerosis*, 204: 1–15, 2009.

Fan, E., Zhang, K., Yao, C. Yan, C., Bai, Y., Jiang, S. Determination of *trans*-resveratrol in China Great Wall “Fazenda” Red Wine by use of micellar electrokinetic chromatography. *Chromatographia*, 62:289-294, 2005.

Feillet-Coudray, C., Sutra, T., Fouret, G., Ramos, J., Wruniak-Cabello, C., Cristol, J.P., Coudray, C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 46:624–632, 2009.

Feillet-Coudray, C., Sutra, T., Fouret, G., Ramos, J., Wruniak-Cabello, C., Cristol, J.P., Coudray, C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 46:624–632, 2009.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. Radicais totais: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43(1):61-68, 1997.

Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, 4 (2): 32-39, 2007.

Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31:435-445, 2010.

Ghorbani, A. Varedi, M., Hadjzadeh M.A., Omrani, G.H. Types-1 diabetes induces depot-specific alterations in adipocyte diameter and mass of adipose tissues in the rat. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 118(7):442-448, 2010.

Giacco, F., Browlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9):1058-1070, 2010.

Giugliano, D. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 3(19):257-267, 1996.

Gleissner, C. A., Galkina, E., Nadler J.L., Ley, K. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4(3):131-140, 2007.

Gomez R.; Vargas C.R.; Wajner M.; Barros H.M. Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. *Brain Research*, 968(2):281-4, 2003.

Grinder- Pedersen, L., Rasmussen, S.E., Bugel, S., Jorgensen, L.V., Dragsted, L.O., Gundersen, V., Sandström, B. Effect of diets based on foods from conventional versus organic production on intake and excretion of flavonoids and markers of antioxidative defense in humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51:5671-5676, 2003.

Grover, J.K., Vats, V., Rathi, S.S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Journal of Ethnopharmacology*, 73:461-470, 2000.

Guaratini, T., Medeiros, M.H.G., Colepicolo, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, 30(1):206-213, 2007.

Guarino M.P.; Santos A.I.; Mota-Carmo M.; Costa P.F. Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats. *In Vivo*, 27(1):127-32, 2013.

Halliwell, B., Gutteridge, JCM. *Free Radical in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford University Press, 1999.

Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 59(5):1623-1629, 1992.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4 ed. Editora Oxford 2007.

Han H., Hwang, I.A., Park, J.H., Lee, H.B. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82:42-45, 2008.

Herrmann, H. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 186:1-5, 1988.

Holst, B., Williamson, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:73-82, 2008.

Hu, M. Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6):803-806, 2007.

IDF. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas fifth edition*. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden/> acesso em: 17/10/2013.

Ifoam. International Federation of Organic Agriculture Movements. Disponível em: <http://www.ifoam.org/en/organic-landmarks/principles-organic-agriculture>. Acesso em: 10/10/2013.

Jones, D.P., Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chemico- Biological Interactions*, 163(1):38-53, 2006.

Junior, A., Dahir, R., Souza, R. B., Santos, S.A., Os radicais totais de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31(1):60-68, 2005.

Kahn, CR; Weir, GC; King, GL; Jacobson, AM; Moses, AC; Smith, RJ. *Joslin Diabetes Mellito*. Tradução: Werneck, Bolner e Machado, 14ª edição, pag. 575-596, Porto Alegre: Artmed, 2009.

Kamalesh, M. Heart failure in Diabetes and related Conditions. *Journal of Cardiac Failure*, 13:861-873, 2007.

Kamboj, A., Kumar, S., Kumar, V. Evaluation of Antidiabetic Activity of Hydroalcoholic Extract of *Cestrum nocturnum* Leaves in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1:1-15, 2013.

Kasinske, B.L., O'donnell, M.P., Cowardin, W., Keane, W. Lipidis and the kidney. *Hipertension*, 15:443-450, 1990.

Kaspar, J.M., Niture, S.K., Jaiswal, A.K. Nrf2:INrf2 (Keap 1) Signaling in Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9):1304-1309, 2009.

Kaul, N., Siveski-Iliskovic, N., Thomas, T.P., Hill, M., Khaper, N., Singal, P.K. ProbucoI improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition*, 11(5):551-554, 1995.

- Keane, W.F., O'Donnell, M.P., Kasiske, B.L., Schmitz, P.G. Lipids and the progression of renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1(5):69-74, 1990.
- Kharrazi, H., Vaisi-Raygani, A., Rahimi Z., Tavilani, H., Aminian, M., Pourmotabbed, T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clinical Biochemistry*, 41(12):932-936, 2008.
- Kimball, S. R., Vary, T. C., Jefferson, L. S. Regulation of protein synthesis by insulin. *Annual Review of Physiology*, 56:321-348, 1994.
- Kumar, S., Prasad, S., Sitasawad, L. Multiple Antioxidants Improve Cardiac Complications and Inhibit Cardiac Cell Death in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Plos One*, 8(7):1-12, 2013.
- Landete, J.M. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7):706-721, 2013.
- Leahy, J. L. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research*, 36:197-209, 2005.
- Lee, A.Y., Chung, S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13:23-30, 1999.
- Lee, W.C., Wang, C.J., Chen, Y.H., Hsu, J.D., Cheng, H.C., Chen, H.J., Lee, H.J. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:2206–2210, 2009.
- Leifert, W.R., Abeywardena, M.Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, 28(11):729-37, 2008.
- Leite, H.P., Sarni, R.S. Radicais totais, antioxidantes e nutrição. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 18(2):60-65, 2003.
- Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51:216-226, 2008.

- Limaye, P.V., Raghuram, N., Sivakami, S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular Cellular Biochemistry*, 243:147-152, 2003.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265–267, 1951.
- Malacrida, C.R.; Motta, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4):659-664, 2005.
- Mansouri, E., Panahi, M., Hhaffari, M.A., Ghorbani, A. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on oxidative stress induced by diabetes in rat kidney. *Iranian Biomedical Journal*, 15(3):100-106, 2011.
- Marcelino, S., Pinhão, S. Diabetes Mellitus e micronutrientes: Uma revisão. *Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição*, 10:32-37, 2007.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *Biochemistry Molecular Toxicology*, 17 (1):24-38, 2003.
- Mazza, G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Review of Food, Science and Nutrition*, 35:341-371, 1995.
- Miele, A. Free amino acids in Brazilian grape juices. *Revista di Viticultura e di Enologia, Conegliano*, 43(4):15-21, 1990.
- Mitra, E., Ghosh, A.K., Ghosh, D., Mukherjee, D., Chattopadhyay, A., Dutta, S., Pattari, S.K., Bandyopadhyay, D. Protective effect of aqueous Curry leaf (*Murraya koenigii*) extract against cadmium-induced oxidative stress in rat heart. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5):1340-1353, 2012.
- Mizushige, K., Yao, L., Noma, T., Kiyomoto, H., Yu, H., Hosomi, N. et al. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation*, 101:899:907, 2000.

- Mokni, M., Guesmi, S.H., Amri, M., Marzouki, L. Grape Seed and Skin Extract Protects Against Acute Chemotherapy Toxicity induced by Doxorubicin in Rat Heart. *Cardiovascular Toxicology*, 12:158-165, 2012.
- Monagas, M. Ledesma, B.H., Cordoves, C.G., Bartolome, B. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinefera* L. leaves and grape skins. Antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2):319-327, 2006.
- Monteiro, R., Soares, R., Guerreiro, S., Pestana, D., Calhau, C., Azevedo, I. Red wine increases adipose tissue aromatase expression and regulates body weight and adipocyte size. *Nutrition*, 25:699–705, 2009.
- Mooradian, A.D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 5(3):150-159, 2009.
- Moore, K., Roberts, L.J. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 28(6):659-671, 1998.
- Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M.C., Blomhoff, R. Polyphenol and glutathione synthesis regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81:277-238, 2005.
- Motta, V.T. *Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações*. 4^a edição, Editora Médica Missau e EDUCS, 1:264, 2003.
- Mukinga, J.T., Eagles, P.F. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice rats. *Journal of Ethnopharmacology* 128 (1): 236-240, 2010.
- Murakami, A., Ohnishi K. Target molecules of food phytochemicals: Food science bound for the next dimension. *Food and Function*, 3:462-476, 2012.
- Nain, P., Saini, V., Sharma, S., Nain, J. Antidiabetic and antioxidant potential of *Embllica officinalis* Gaertn. leaves extract in streptozotocin-induced type-2diabetes mellitus (T2DM). *Journal of Ethnopharmacology* 142 (1): 65–71, 2012.

Nathan. D.M., Lachin, J., Cleary, P. Orchard, T., Brillon, D.J.; Backlund, J.Y. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 348:2294-2303, 2003.

Nauseef, W.M. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica end Biophysica Acta*, 1840:757–767, 2014.

Negri, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(2):121-142, 2005.

Nijveldt, R.J., van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74:418–25, 2001.

Nixdorf, S.L., Gutierrez, I.H. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, v. 659, p. 208-215, 2010.

Ohakawa, H.; Ohishi, H.; Yagi, K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95:351-358, 1979.

Okutan, P.A., Ozcelik, N., Yilmaz, H.R., Uz, E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinica Biochemistry*, 38:191–196, 2005.

Oliboni, L.S., Dani, C., Funchal, C., Henriques, J.A.P., Salvador, M. Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. Bordo) on wistar rats tissues. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83(4): 1403-1411, 2011.

Oliboni, L.S., Henriques, J.A.P., Dani, C. Salvador, M. Antioxidant activity of *Vitis labrusca* grapevine leaves *Ciência e Movimento*, 21:39-44, 2009.

Omara, E.A., Nada, S.A., Farrag, A.R, Sharaf W.M, El-Toumy, S.A. Therapeutic effect of *Acacia nilotica* pods extract on stretozotocin induced diabetic nephropathy in rat. *Phytomedicine*, 19(12):1059-1067, 2012.

- Orhan, D.; Orhan, N.; Ergun, E.; Ergum, F. Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 112:145–151, 2007.
- Orhan, N.; Aslan, M.; Orhan, D.D.; Ergun, F.; Ilada, E.Y. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 108:280–286, 2006.
- Pacher, P., Obrosova, I.G., Mabley, J.G., Szabó, C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therepeutical strategies. *Current Medicinal Chemistry*, 12(3):267-275, 2005.
- Pal, S., Naissides, M., Mamo, J. 2004. Polyphenolics and fat absorption. *International Journal of Obesity*, 28:324–326, 2004.
- Palsamy P., Subramanian, S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812:719–731, 2011.
- Pari, S., Suresh, A. Effect of grape (*Vitis vinefera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. *Food and Chemiocal Toxicology*, 46:1627-1634, 2008.
- Park, Y.K., Park, E., Kim, J.S., Kang, M. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutation Research*, 529:77–86, 2003.
- Perron, N.R., Brumaghim, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysic*, 53:75–100, 2009.
- Pontes, P.R.B., Santiago, S.S., Szabo, T.N., Toledo, L.P., Gollucke, A.P.B. Atributos sensoriais e aceitação de sucos de uva comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30:313-318, 2010.
- Priour, C. Rigaud, J. Cheynier, V. Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36:781-784, 1994.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, 68:125-131, 2013.

Rains, J.L., Jain, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes Free Radical Biology & Review. *Journal Biochemistry Molecular Toxicology*, 17:(1)24-38, 2003.

Ratnan, D. V., Ankola, D.D., Bhardwaj, D.K., Sahana M.N.V., Kuma, R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective review. *Journal of Controlled Release*, 113(3):189-207, 2006.

Rauscher, F.M., Sanders, R.A., Watkins, J.B. III. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 15:41-46, 2001.

Reis, J.S., Veloso, C.A., Mattos, R.T., Purish, S., Nogueira-Machado, J.A. Estresse Oxidativo: Revisao da Sinalizacao Metabolica no Diabetes Tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Metabologia e Endocrinologia*, 52(7):1096-1105, 2008.

Reznick, A.Z., Packer, L. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233:357–363, 1994.

Rho, K.A., Kim, M.K. Effects of different grape formulations on antioxidative capacity, lipid peroxidation and oxidative DNA damage in aged rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52:33–46, 2006.

Rizzon, L.A., Mielle, A. Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil. *Ciência Rural*. 36(3):959-964, 2006.

Rizzon, L.A., Salvador, M.B. G., Mielle, A. Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. *Ciência e Tecnologia Alimentos* 28(3):635-641, 2008.

Rodrigo, R., Miranda, A., Vergara, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412:210-424, 2011.

Rodrigues, A.D., Scheffel, T.B., Scola, G.S., Santos, B.F., Dani, C., Vanderlinde, R., Henriques, J.A.P, Coitinho, A.S., Salvador, M. Purple grape juices prevent pentylentetrazol-induced oxidative damage in the liver and serum of Wistar rats. *Nutrition Research*, 33:120-125, 2013.

Roghani, M., Baluchenejadmojarad, T. Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology*, 17:55–59, 2010.

Rolo, A.P., Palmeira, C.M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212:167-178, 2006.

Ross, J.A., Kasum, C.M. Dietary Flavonoids, Bioavailability Metabolic Effects and Safety. *Annual Review of Nutrition*, 22:19-34, 2003.

Saha J.K.; Xia J.; Grondin J.M.; Engle S.K.; Jakubowski J.A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Experimental Biology and Medicine*, 230(10):777-84, 2005.

Santos, L.P., Morais, D.R., Souza, N.E., Cottica, S.M., Boroski, M., Visentainer, J.V. Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes *Food Research International*, 44:1414-1418, 2011.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diabetes tipo 1. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/diabetes-tipo-1> Acesso em: 15/10/2013.

Schmatz, R., Perreira, L.B., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., Gutierrez, J., Bagatini, M., Martins, C.C., Fátima, Abdalla, F.H., Serres, J.D., Daniela Zanini, Vieira, J.M., Cardoso, A.M., Schetinger, M.R., Morsch, V.M. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced rats. *Biochimie*, 94(2):374-383, 2012.

Schneider, E., Von der Heydt, H., Esperester, A. Evaluation of polyphenol composition in red leaves from different varieties of *Vitis vinifera*. *Planta Medica*, 74(5):565–572, 2008.

Sefi, M., Fentoui, H., Makni, M., Zeghal, N. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48:1986–1993, 2010.

Sefi, M., Fetoui, H., Soudani, N., Chtourou, Y., Makni, M., Zeghal, N. *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. *Pathology – Research and Practice*, 208:157-162, 2012.

Shen X., Zheng S., Metreveli, N.S., Epstein, P.N. Protection of cardiac mitochondria by Overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, 55:798–805, 2006.

Shen, X., Zheng, S., Metreveli, N.S. Epstein, P.N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, 55(1):798-805, 2006.

Silva, M., Lima, W.G., Silva, M.E., Pedrosa, M.L. Efeito da streptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 55:1-47, 2011.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Porto Alegre/Florianópolis Ed.Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999.

Sinet, P.M. Garber, P. Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to O₂ and H₂O₂. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 212:411-416, 1981.

Singh, P.K., Baxi, D., Banerjee, S., Ramachandran, A.V. Therapy with methanolic extract of *Pterocarpus marsupium* Roxb and *Ocimum sanctum* Linn reverses dyslipidemia and oxidative stress in alloxan induced type I diabetic rat model. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64:441-448, 2012.

Singh, R., Kaur, N., Kishore, L., Gupta, G.K. Management of diabetic complications: A chemical constituents based approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 150:51–70, 2013.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. In: Packer, L. (Ed.), *Methods in Enzymology, Oxidant and Antioxidant (Part A)*. Academic Press, San Diego, CA 159–178, 1999.

Solomon, G., Raosaheb, K.K., Nazma, B. Alteration in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of Vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Molecular Cellular Biochemistry*, 236:7-12, 2002.

Stephens, J.W., Khanolkar, M.P., Bain, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202:321-329, 2009.

Stervbo, U., Vang, O., Bonnesen, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, 101(2):4499-457, 2007.

Strother, R.M., Thomasa, T.G., Otsyulab, M., Sanders, R.A., Watkins, J.B. Characterization of oxidative stress in various tissues of diabetic and galactose-fed rats. *International Journal of Diabetes Research*, 2:211-216, 2001.

Sukla, K., Diskshit, P., Tyagi, M.K., Shukla, R., Gambhir. Ameliorative effect of *Withania coagulans* on dyslipidemia and oxidative stress in nicotinamide–streptozotocin induced diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, 50:3595-3599, 2012.

Sun, L., Halaihel, N., Zhang, W., Rogers, T., & Levi, M. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:18919-18927, 2002.

Sun, Y.M., Su, Y., Li, J., Wang, L. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropath. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433:359-361, 2013.

Suwannaphet, W., Meeprom, A., Yibchok-Anun, S., Adisakwattana, S. Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 48:1853-1857, 2010.

Vadillo M., Ardévol A., Fernández-Larrea J., Pujadas G., Bladé C., Salvadó M.J., Arola L., Blay M. Moderate red-wine consumption partially prevents body weight gain in rats fed a hyperlipidic diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17:139-142, 2006.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser. J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*., 39 (1):44-84, 2007.

Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Benfato, V.M.M.; Kubota, L.T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. *Química Nova*,30(5):1323-1338, 2007.

Welt, K. Weiss, J., Martin, R. Hermsdorf, T., Drews, S., Fitzl, G. Ginkgo biloba extract protects rat kidney from diabetic and hypoxic damage. *Phytomedicine*, 14(3):196-203, 2007.

WHO. World Health Organization. Diabetes. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>
Acesso em: 15/10/2013.

Yang, Y.S., Huang, C.N., Wang, C.J., Lee, Y.J., Chen, M.L., Peng, C.H. Polyphenols of Hibiscus sabdariffa improved diabetic nephropathy and via regulating the pathogenic markers and kidney functions of type 2 diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 5:810-819, 2013.

Zern, T.L., Fernandez, M.L. Cardioprotective effect of dietary polyphenols *Journal of Nutrition*, 135:2291-2294, 2005.

Zhang, L., Hogan, S., Li, J., Sun, S. Canning, C., Zheng, S., Zhou, K. Grape skin extract inhibits mammalian intestinal α -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-treated mice. *Food Chemistry*, 126:466-471, 2011.

Zhou, Y.T., Graybum, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D. et al Lipotoxic heart disease on obese rats: implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 97:1784-1789, 2000.

9. Anexo I

Parecer de aprovação CEUA/UFRGS



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 22445

Título: Efeito do extrato de folhas de vitis labrusca orgânica sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em ratos diabéticos

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ROSANE GOMEZ - coordenador desde 02/03/2012
Denise dos Santos Lacorda - pesquisador desde 02/03/2012

Equipe Externa:

Claudia da Silva Funchal - pesquisador desde 02/03/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 16/04/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar, no Prédio da Reitoria, Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 88 ratos machos, adultos, Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 23 de Abril de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética