

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos
Dissertação de Mestrado



**Efeitos bioquímicos e metabólicos da administração de farinha do
bagaço de uvas em modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo 2**

Raphaela Cassol Piccoli

Pelotas-RS, 2023

Raphaela Cassol Piccoli

**Efeitos bioquímicos e metabólicos da administração de farinha do
bagaço de uvas em modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo 2**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane Giacomelli Tavares

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello

Pelotas-RS, 2023

Raphaela Cassol Piccoli

**Efeitos bioquímicos e metabólicos da administração de farinha do
bagaço de uvas em modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo 2**

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de
Mestra em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e
Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 10/08/2023

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Rejane Giacomelli Tavares (Orientadora) – Doutora em Ciências
Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello (Coorientadora) - Doutora em Ciências
Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof.^a Dr.^a Jucimara Baldissarelli – Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica
Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel – Doutor em Ciências Biológicas -
Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho. Sem dúvidas, sou a soma de tudo aquilo que depositaram em mim.

Inicio meus agradecimentos pela primícia, Deus. Por guiar meus passos, iluminar meu caminho e me proporcionar a oportunidade de trilhar esta jornada de conhecimento e aprendizado.

Sou imensamente grata aos meus pais, Carmem e Ricardo, que nunca mediram esforços para se doarem por mim e minha irmã, Mariana. Agradeço pelo amor, incentivo e apoio incondicional, pelas inúmeras oportunidades e por sempre estarem presentes, mesmo à distância.

Agradeço aos meus queridos avós, Angelino e Teresinha, pelas palavras de carinho e apoio, e por sempre terem acreditado em mim.

Ao meu namorado, William, por ser meu porto seguro, maior incentivador e melhor amigo. Agradeço por sua paciência, compreensão, motivação e por dedicar seu tempo para me auxiliar na concretização deste trabalho. Muito obrigada pelo amor incondicional e por ser uma parte tão importante da minha vida e desta jornada acadêmica.

À minha orientadora, Rejane Giacomelli Tavares, pela sua dedicação, orientação cuidadosa e valiosas contribuições para o desenvolvimento desta pesquisa.

À minha coorientadora, Francieli Moro Stefanello, por sua presença alegre e por compartilhar seu conhecimento e experiência, fundamentais para a realização deste trabalho.

À professora Roselia Maria Spanevello, cuja dedicação ao ensino e à pesquisa é inspiradora, minha gratidão pelas palavras de incentivo e motivação.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Solange, Kelen, Julia, Karina, Anita e Bernardo, com quem compartilhei risadas e desafios ao longo dessa jornada. Agradeço pela amizade, conhecimento compartilhado e por tornarem

os dias mais divertidos. Todos desempenharam um papel crucial na minha jornada acadêmica.

A todos os integrantes do grupo NeuroBio. Sou grata pela colaboração e apoio que recebi de cada um de vocês.

À toda a equipe do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Agradeço pela atenção, zelo no manejo dos animais e pela disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, por todo o conhecimento adquirido.

À Universidade Federal de Pelotas por proporcionar um ensino de qualidade e ambiente propício para o desenvolvimento da ciência.

Por fim, sou grata a toda minha família e amigos por estarem presentes e serem cruciais nessa jornada. Minha sincera gratidão a todos.

RESUMO

PICCOLI, Raphaela Cassol. **EFEITOS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE FARINHA DO BAGAÇO DE UVAS EM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2**. 2023. 151p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

O Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico associado à obesidade, fatores genéticos, inatividade física e dieta inadequada, o que pode levar a doenças cardiovasculares (DCV), desequilíbrio oxidativo e desordens cognitivas. Muitos compostos vêm sendo estudados como potenciais recursos no tratamento e/ou prevenção desta doença, como os derivados da uva. Dentro deste contexto, a farinha do bagaço de uva (FBU), obtida após processamento do bagaço, tem sido avaliada. Esta contém nutrientes, fibras solúveis e insolúveis, e compostos antioxidantes. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da administração de FBU das castas 'Arinto' e 'Touriga Nacional' sobre parâmetros bioquímicos séricos, oxidativos, comportamentais e histológicos em ratos Wistar machos adultos, onde avaliamos o potencial protetor da suplementação de 10% de FBU em um modelo pré-clínico de DM2 induzido por dieta hiperlipídica (DHL) durante 28 dias e estreptozotocina (35 mg/kg) em dose única no 21º dia. Após a realização do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) no 24º, e a realização do teste do campo aberto (TCA) e labirinto em cruz elevado (TLCE) no 28º dia, os animais foram eutanasiados e foram coletados soro, córtex cerebral, hipocampo, fígado e pâncreas para realização das análises posteriores. A indução experimental de DM2 resultou em diversos distúrbios metabólicos, como evidenciado pelo TOTG, área sob a curva e glicemia sérica. Além disso, foram observados poliúria e aumento significativo do peso corporal, elevação na concentração sérica de TG, CT e índice TyG. Houve, ainda, a indução de comportamento tipo-ansioso, conforme observado no TLCE. Quando avaliados os parâmetros de estresse oxidativo foi observado aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em hipocampo, elevação nos níveis de nitritos e diminuição da atividade da enzima catalase (CAT) em córtex, aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitritos, além da diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase em fígado. No pâncreas, foram observados vacúolos em células acinares e vasos congestionados. Por outro lado, o tratamento com FBUB e FBUT mostrou efeitos protetores nos distúrbios do metabolismo glicêmico e lipídico, redução da concentração de ácido úrico e creatinina, bem como das transaminases ALT e aspartato aminotransferase (AST). Além disso, o comportamento tipo-ansioso foi atenuado, e houve diminuição nos níveis de TBARS e EROs em córtex cerebral, com estímulo da atividade da enzima CAT. Os tratamentos também proporcionaram proteção contra o aumento de TBARS no fígado, além de proteger as ilhotas beta pancreáticas frente à citotoxicidade observada no contexto da resistência à insulina. Os resultados sugerem que os subprodutos da uva podem desempenhar uma abordagem promissora para mitigar os efeitos deletérios do DM2, contribuindo para estratégias terapêuticas e dietéticas voltadas para a saúde.

Palavras-chave: farinha de bagaço de uva, Touriga Nacional, Arinto, diabetes, compostos fenólicos.

ABSTRACT

PICCOLI, Raphaela Cassol. **BIOCHEMICAL AND METABOLIC EFFECTS OF GRAPE POMACE FLOUR ADMINISTRATION IN AN ANIMAL MODEL OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS**. 2023. 151p. Master's dissertation – Post Graduation Program in Nutrition and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a metabolic disorder associated with obesity, genetic factors, physical inactivity, and inadequate diet, which can lead to cardiovascular diseases (CVD), oxidative imbalance, and cognitive disorders. Many compounds have been studied as potential resources in the treatment and/or prevention of this disease, such as grape derivatives. In this context, grape pomace flour (GPF), obtained after processing grape pomace, has been evaluated. It contains nutrients, soluble and insoluble fibers, and antioxidant compounds. The aim of this study was to investigate the effects of administering GPF from the 'Arinto' and 'Touriga Nacional' grape varieties on serum biochemical, oxidative, behavioral, and histological parameters in adult male Wistar rats. We assessed the potential protective effect of 10% GPF supplementation in a preclinical model of T2DM induced by a high-fat diet (HFD) for 28 days and a single dose of streptozotocin (35 mg/kg) on the 21st day. After performing the oral glucose tolerance test (OGTT) on the 24th day, and the open field test (OFT) and elevated plus maze (EPM) test on the 28th day, the animals were euthanized, and serum, cerebral cortex, hippocampus, liver, and pancreas were collected for further analyses. The experimental induction of T2DM resulted in various metabolic disturbances, as evidenced by OGTT, area under the curve, and serum glucose levels. Additionally, polyuria and a significant increase in body weight, elevation in serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and TyG index were observed. Induction of anxiety-like behavior was also observed in the EPM. When assessing oxidative stress parameters, increased levels of reactive oxygen species (ROS) were observed in the hippocampus, elevated levels of nitrites and decreased catalase (CAT) enzyme activity in the cortex, increased levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and nitrites, as well as decreased superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in the liver. Vacuoles in acinar cells and congested vessels were observed in the pancreas. On the other hand, treatment with GPF from 'Arinto' and 'Touriga Nacional' grapes showed protective effects on glycemic and lipid metabolism disorders, reduction in uric acid and creatinine levels, as well as in the transaminases alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Furthermore, anxiety-like behavior was attenuated, and there was a decrease in TBARS and ROS levels in the cerebral cortex, with enhanced CAT enzyme activity. The treatments also provided protection against increased TBARS in the liver, and protected pancreatic beta cells from cytotoxicity observed in the context of insulin resistance. The results suggest that grape byproducts may offer a promising approach to mitigate the deleterious effects of T2DM, contributing to therapeutic and dietary strategies for health.

Keywords: grape pomace flour, Touriga Nacional, Arinto, diabetes, phenolic compounds.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P591e Piccoli, Raphaela Cassol

Efeitos bioquímicos e metabólicos da administração de farinha do bagaço de uvas em modelo animal de diabetes mellitus tipo 2 / Raphaela Cassol Piccoli ; Rejane Giacomelli Tavares, orientadora ; Francieli Moro Stefanello, coorientadora. — Pelotas, 2023.

151 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Farinha de bagaço de uva. 2. Touriga nacional. 3. Arinto. 4. Diabetes. 5. Compostos fenólicos. I. Tavares, Rejane Giacomelli, orient. II. Stefanello, Francieli Moro, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína cinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
A.U.C	Área sob a curva
BU	Bagaço de uva
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CCL	Comprometimento cognitivo leve
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Colesterol Total
Cu ²⁺	Íon cobre
DA	Doença de Alzheimer
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2,7-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças Cardiovasculares
DHL	Dieta Hiperlipídica
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)
DV	Demência vascular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FBU	Farinha do bagaço de uvas
FBUB	Farinha do bagaço de uvas brancas
FBUT	Farinha do bagaço de uvas tintas
FOXO1	Proteína forkhead box O1

GLUT	Transportador de Glicose
GSH	Glutationa
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GST	Glutationa S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IDF	Federação Internacional de Diabetes
I.G	Intragástrica
I.P	Intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
KCl	Cloreto de potássio
MAPK	Proteína de ativação mitogênica
MDA	Malondialdeído
Met	Metformina
Mn ²⁺	íon Manganês
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{-·}	Ânion superóxido
OH•	Radical hidroxila
OIV	Organização Internacional de Videiras e Vinhos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Salina-fosfato
PI3K	Fosfoinositídeo-3-cinase
RI	Resistência à Insulina
Ser	Serina
SGLT1	Transportador de glicose dependente de sódio
-SH	Grupamentos tiois
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema Nervoso Central

SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TA	Tecido adiposo
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Teste do Campo Aberto
TG	Triglicerídeos
TLCE	Teste do Labirinto em Cruz Elevado
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
Tyr	Tirosina
Zn ²⁺	Íon Zinco

Lista de figuras

Figura 1	Via de sinalização da insulina iniciada pela ligação da insulina no receptor até a translocação do transportador de glicose	23
Figura 2	<i>Vitis vinifera</i> 'Touriga Nacional' (A) e <i>Vitis vinifera</i> 'Arinto' (B)	32
Figura 3	Representação do protocolo experimental de DM2	35
Figura 4	Teste oral de tolerância à glicose demonstrando a variação da glicemia em jejum e após 30, 60 e 120 minutos de sobrecarga oral de glicose (A) e área sob a curva (B)	41
Figura 5	Ganho de peso absoluto semanal ao longo de três semanas de consumo de dieta normolipídica, DHL, DHL suplementada com FBUB ou DHL suplementada com FBUT e perda de peso após administração de STZ	44
Figura 6	Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta nos níveis séricos de glicose (A), triglicerídeos (B), colesterol (C) e HDL (D) em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	46
Figura 7	Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta no Índice Triglicerídeos x Glicose em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	47
Figura 8	Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta nos níveis séricos de ácido úrico (A), ureia (B), creatinina (C), proteína (D), atividade das transaminases AST (E) e ALT (F) em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	48
Figura 9	Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta no Teste do Campo Aberto, referente aos cruzamentos totais (A) e número de levantamentos (B)	49

em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2

Figura 10 Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta no Labirinto em Cruz Elevado, referente ao % de entradas no braço aberto (A) e % de tempo no braço aberto (B) de ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2 49

Figura 11 Características histológicas pancreáticas de ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2 tratados com Metformina ou farinha do bagaço de uva branca ou tinta. (A-C) CT, controle; (D-F) DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; (G-H) DM2+Met, DM2 + Metformina, (J-L) FBUB, farinha do bagaço de uva branca, (M-O) FBUT, farinha do bagaço de uva tinta. 57

Lista de tabelas

Tabela 1	Composição da dieta hiperlipídica utilizada no protocolo experimental para indução de DM2.	33
Tabela 2	Composição centesimal e valor calórico das dietas experimentais	40
Tabela 3	Efeito da administração de dieta hiperlipídica e STZ e tratamento com Met e FBUB ou FBUT no consumo alimentar, ingestão hídrica, ganho de peso total, peso relativo do pâncreas e tecido adiposo	43
Tabela 4	Efeito da administração de dieta hiperlipídica e STZ e tratamento com Met e FBUB ou FBUT em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos a um protocolo de indução experimental de DM2	52
Tabela 5	Efeito da administração de dieta hiperlipídica e STZ e tratamento com Met e FBUB ou FBUT em parâmetros de estresse oxidativo em fígado de animais submetidos a um protocolo de indução experimental de DM2	55

Sumário

1. Introdução	16
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Revisão Bibliográfica	19
3.1 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	19
3.2 Estresse oxidativo	24
3.3 Compostos fenólicos	27
3.4 Farinha do bagaço de uvas	28
4. Materiais e Métodos	31
4.1 Obtenção das farinhas do bagaço de uvas	31
4.2 Dieta experimental para indução de DM2	32
4.3 Composição centesimal das dietas experimentais.....	33
4.4 Animais e aspectos éticos	33
4.5 Protocolo experimental de DM2	33
4.6 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	35
4.7 Parâmetros comportamentais	35
4.8 Eutanásia e obtenção de amostras biológicas	36
4.9 Dosagens bioquímicas	36
4.10 Avaliação de marcadores de estresse oxidativo.....	36
4.11 Análise estatística.....	38
5. Resultados	38
5.1. Composição centesimal das rações experimentais.....	38
5.2. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	39
5.3. Parâmetros metabólicos.....	41
5.4. Parâmetros bioquímicos séricos	44
5.5. Parâmetros comportamentais	47
5.6 Parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo	49
5.7 Parâmetros de estresse oxidativo em fígado	53
5.8 Análises histológicas em pâncreas.....	55
6. Discussão.....	57
7. Conclusão	65

8. Referências Bibliográficas	66
Anexo 1 - Carta de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA-UFPel)	78
Anexo 2 - Artigo de revisão	79
Anexo 3 - Manuscrito.....	118

1. Introdução

O Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica crônica e progressiva caracterizada pela disfunção das células β -pancreáticas que leva à hiperglicemia resultante da falha na utilização de insulina (ZHOU *et al.*, 2022). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência global (padronizada por idade) de diabetes quase dobrou entre os anos de 1980 e 2014 (OMS, 2014). O desenvolvimento desta doença tem origem multifatorial, sendo desencadeada por fatores genéticos e/ou ambientais, como a ingestão calórica excessiva, composição da dieta e inatividade física (KHUTAMI *et al.*, 2022).

Tendo em vista que o DM2 contribui para a ocorrência de desfechos micro e macrovasculares nocivos, é de grande importância explorar novas alternativas terapêuticas e preventivas para esta importante desordem metabólica (ZHOU *et al.*, 2022). De acordo com a OMS, o consumo de legumes, frutas e leguminosas – ricos em compostos antioxidantes e fibra dietética – está associado a uma menor incidência de síndrome metabólica (SM) e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (OMS, 2002). A comunidade científica tem se dedicado a investigar os efeitos de produtos naturais e seus derivados, avaliando não somente as atividades biológicas, mas também sua segurança e eficácia (CHANG & KIM, 2019).

Nos últimos anos, revisões importantes vêm descrevendo os efeitos fitoquímicos e farmacológicos da uva e de seus derivados devido aos numerosos compostos bioativos, como fibras, antioxidantes e componentes polifenólicos de sua composição química (AVERILLA *et al.*, 2019; GOMEZ-BRANDON *et al.*, 2019; ANTONIC *et al.*, 2020). A uva (*Vitis sp.*) é cultivada em todo o mundo e a maior parte de sua produção é destinada à fabricação de vinho. O vinho é uma importante fonte de compostos polifenólicos e antioxidantes que apresenta proteção cardiovascular quando consumido moderadamente (MUNOZ-BERNAL *et al.*, 2018).

A Organização Internacional da Vinha e do Vinho estima que tenham sido produzidos aproximadamente 26 bilhões de litros ao redor do mundo entre 2021 e 2022. Portugal ocupa a quinta posição entre os maiores produtores de vinho da União Europeia (OIV, 2022), sendo que as variedades de uva 'Touriga

Nacional' e 'Arinto' estão entre as mais cultivadas para a fabricação de vinhos tinto e branco, respectivamente (CORREIA & JORDÃO, 2015). Também no Brasil, e especialmente no Rio Grande do Sul, a produção compreende 90% do total nacional de uvas que são destinadas ao processamento (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019). De acordo com dados da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Produção Sustentável e Irrigação, no ano de 2022, foram produzidos no estado aproximadamente 243 milhões de litros de vinho e cultivados mais de 683.000 toneladas de uva (SISDEVIN, 2022).

Tendo em vista a significativa produção mundial de vinho, cabe ressaltar que a indústria vinícola apresenta expressivas perdas como resultado do processamento das uvas. Os principais subprodutos do processo de vinificação são pouco valorizados ou aproveitados e, muitas vezes, são descartados de maneira inadequada, constituindo assim uma questão econômica e ecológica (AVERILLA *et al.*, 2019). O bagaço de uva (BU) pode ser obtido a partir de resíduos da indústria vinícola – composto por casca, caules, sementes e outros resíduos sólidos, ricos em compostos fenólicos e fibras alimentares – durante o processo de vinificação. Este subproduto quando seco e moído dá origem a um ingrediente funcional que pode ser utilizado na panificação e suplementação alimentar, a farinha do bagaço de uva (FBU). O consumo diário de alimentos enriquecidos com FBU vem mostrando efeitos benéficos sobre parâmetros antioxidantes e bioquímicos em modelos animais e em humanos que apresentam desordens metabólicas (URQUIAGA *et al.*, 2015; CHARRADI *et al.*, 2017; URQUIAGA *et al.*, 2018; RIVERA *et al.*, 2019).

Por se tratar de um produto natural, de aplicabilidade simples, com elevada concentração de compostos bioativos e fibra dietética em sua composição, torna-se extremamente importante investigar a possível ação dos princípios ativos presentes na FBU sobre parâmetros antropométricos, bioquímicos, metabólicos, histológicos, oxidativos e comportamentais relacionados à DM2. Desta forma, contribuir para o desenvolvimento de ferramentas preventivas ou terapêuticas auxiliares nesta desordem metabólica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do consumo de FBU de duas castas ('Touriga Nacional' e 'Arinto') em parâmetros antropométricos, bioquímicos, histológicos, oxidativos e comportamentais em modelo experimental de DM2.

2.2 Objetivos específicos

a) Avaliar os efeitos do consumo de FBU de duas castas ('Touriga Nacional' e 'Arinto') em modelo animal de DM2 induzida por DHL e STZ, em relação aos seguintes parâmetros:

- Metabólicos:
 - Ganho de peso semanal e peso final;
 - Peso relativo do pâncreas e do tecido adiposo visceral.

- Bioquímicos séricos:
 - Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) após sobrecarga oral de glicose;
 - Glicemia;
 - Perfil lipídico através da mensuração dos níveis de CT, TG, e HDL;
 - Determinação de ureia, ácido úrico, creatinina, proteína e atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato alanintransferase (AST).

- Estresse oxidativo em Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico:
 - Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), nitrito e conteúdo tiólico total;
 - Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

- Comportamentais:
 - Teste do campo aberto, para avaliar locomoção e

capacidade exploratória;

- Teste do labirinto em cruz elevada, para avaliar comportamento tipo-ansioso.

➤ Consumo alimentar e ingestão de água.

➤ Análise histológica de pâncreas, para avaliar danos estruturais.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Diabetes *Mellitus* tipo 2

Diabetes *Mellitus* (DM) consiste em um distúrbio metabólico grave caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de ausência ou insuficiência na síntese do hormônio insulina, ou ainda, inefetividade na utilização da insulina que é produzida (DSDB, 2020). O DM atinge, atualmente, proporções epidêmicas. Estima-se que aproximadamente 536.6 milhões de adultos, com idade entre 20 e 79 anos, sejam acometidos pelo DM, o que representa 10,5% da população mundial pertencente a essa faixa etária. A estimativa é de que a prevalência aumente para 783 milhões em 2045 (IDF, 2021).

A classificação atual do DM baseia-se em sua etiopatogenia e permite o tratamento adequado e a definição de estratégias de rastreamento de comorbidades e complicações crônicas direcionadas a cada variação da doença (DSBD, 2022). De acordo com o documento publicado em 2019, a classificação proposta pela OMS inclui as seguintes classes clínicas: Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1), DM2, formas híbridas de diabetes, outros tipos específicos de DM (diabetes monogênica, doenças do pâncreas exócrino, desordens endócrinas, diabetes induzido por drogas ou produtos químicos, infecções, formas específicas incomuns de diabetes imunomediada, outras síndromes genéticas às vezes associadas ao diabetes), diabetes não classificada e hiperglicemia detectada durante a gravidez. Dentre todos, os mais prevalentes e conhecidos são o DM1 e DM2 (OMS, 2019).

O DM1 é uma doença autoimune e poligênica, caracterizada pela deficiência total na síntese de insulina decorrente da destruição das células β -

pancreáticas, responsáveis por esta produção (DSBD, 2020). A condição pode se desenvolver em qualquer idade, embora o DM1 ocorra com mais frequência em crianças e adultos jovens, acometendo homens e mulheres igualmente (IDF, 2021). Em contrapartida, o DM2 é caracterizado, principalmente, pela resistência à ação da insulina e deficiência parcial de sua secreção pelas células β -pancreáticas. Majoritariamente, o DM2 acomete adultos a partir da quarta década de vida, embora a prevalência em crianças e adolescentes venha aumentando nos últimos anos (OMS, 2019).

No momento presente, o DM2 representa aproximadamente 90% de todos os casos de DM ao redor do mundo, sendo que os fatores de risco para seu desenvolvimento envolvem uma interação de condições genéticas e metabólicas, como sobrepeso e obesidade, etnia, tabagismo, inatividade física e má alimentação (AHMAD *et al.*, 2022).

Quatro testes diagnósticos para DM2 são atualmente recomendados pela Federação Internacional de Diabetes (IDF) e OMS, são eles: a medição da glicemia em jejum $\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL), glicemia 2 horas após o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) com 75 g/kg de glicose $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL), hemoglobina glicada ≥ 48 mmol/mol (equivalente a 6,5%) ou uma glicemia aleatória $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) na presença de sintomas de hiperglicemia (OMS, 2019; IDF, 2021).

Embora a sintomatologia clássica da hiperglicemia persistente inclua poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso inexplicada, estes não acometem a maioria dos pacientes com DM2. Por via de regra, as alterações fisiopatológicas precedem em muitos anos o diagnóstico do DM2, de forma que o momento exato do seu estabelecimento é, geralmente, improvável de ser determinado, podendo seu desenvolvimento ser assintomático (DSBD, 2020). Sendo assim, se o diagnóstico for adiado por um período prolongado, diversas complicações decorrentes do DM2 podem conduzir o diagnóstico final (IDF, 2021).

É descrita ainda uma condição em que os valores glicêmicos se encontram acima dos valores de referência, porém ainda abaixo dos valores considerados para diagnóstico de DM. Este interstício é denominado pré-diabetes. Além de conferir risco aumentado para o desenvolvimento de DM, também está associado ao maior risco de doenças cardiovasculares (DCV) e

complicações associadas, de forma que o diagnóstico é realizado por dosagens laboratoriais de rotina (DSBD, 2020).

As complicações decorrentes do DM2 são tradicionalmente divididas em distúrbios microvasculares (complicações que afetam o fígado e o sistema nervoso, por exemplo) e macrovasculares (como DCV). As complicações cardiovasculares são a principal causa de morbimortalidade entre pacientes com DM2 e complicações renais são altamente prevalentes (ZHENG, LEY & BRU, 2018). Para além de alterações metabólicas extremamente relevantes, o DM tem sido considerado, ainda, fator de risco chave, direta ou indiretamente, para o surgimento de alterações cognitivas e doenças neurodegenerativas, além de ser associado a diversos tipos de câncer, mediados por hiperglicemia, hiperinsulinemia, neuroinflamação e estresse oxidativo (SHI *et al.*, 2022).

Os efeitos a longo prazo do DM2 no cérebro podem se manifestar nos níveis estruturais, neurofisiológicos e neuropsicológicos (MURIACH *et al.*, 2019). O declínio cognitivo observado nestes pacientes pode se apresentar na forma de comprometimento cognitivo leve (CCL), doença de Alzheimer (DA), demência vascular (DV) e outras formas de demência, de forma que o DM2 está associado a um aumento de 50% no risco destas (DAMANIK & YUNIR, 2021). Embora a fisiopatologia do comprometimento cognitivo no DM2 ainda não seja completamente compreendida, a disfunção na sinalização de insulina que leva a uma falha na absorção de glicose e, conseqüentemente, comprometimento na síntese energética no tecido cerebral vem se mostrando como um importante mecanismo subjacente (KANDIMALLA *et al.*, 2017).

Dentro do contexto do DM, o hormônio insulina constitui-se como um ator central do processo. Este é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas e apresenta ação anabólica essencial na manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular (ARNETH, ARNETH & SHAMS, 2019). É secretado, em condições fisiológicas, em resposta pós prandial a elevação da concentração dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos e atua favorecendo a captação de glicose pelos tecidos periféricos (destacam-se músculo e tecido adiposo (TA)) e reduzindo a síntese endógena de glicose (RACHDAOUI, 2020). A glicose circulante é transportada para as células β -pancreáticas pelo transportador de glicose (GLUT2), o que estimula a secreção de insulina. Em seguida, o hormônio se liga ao seu receptor

específico de superfície celular (receptor de insulina, IR) e a via de sinalização da insulina é ativada (MARTÍN & RAMOS, 2021) (Figura 1).

O IR é composto por duas subunidades α e duas subunidades β , sendo assim uma proteína heterotetramérica que atua como enzima alostérica. A subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β , de forma que a ligação da insulina à subunidade α (extracelular) permite que a subunidade β (citossólica) adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do IR, bem como, a fosforilação de substratos proteicos em resíduos de tirosina (Tyr), como os substratos dos receptores de insulina (IRS) (CARVALHEIRA, ZECCHIN & SAAD, 2002; RACHDAOUI, 2020). A fosforilação em Tyr das proteínas IRS favorece os sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre essas moléculas, destaca-se a fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K), que participa da via PI3K/proteína cinase B (Akt), essencial para a maioria das ações metabólicas da insulina.

A ativação dessa via resulta na translocação dos GLUTs responsivos à ação da insulina para a membrana plasmática e o consequente aumento da captação de glicose no músculo esquelético e TA. Já no tecido hepático, a estimulação da via PI3K/AKT leva à ativação da glicogênese e à supressão da gliconeogênese. Além desta, a via da proteína de ativação mitogênica (MAPK) tem origem na fosforilação dos IR e é essencial para os efeitos da insulina no crescimento e diferenciação celular, assim como na síntese de proteínas, embora não esteja envolvida na mediação das ações metabólicas deste hormônio. Sendo assim, fica claro que a regulação rigorosa da sinalização da insulina é crucial para a manutenção da homeostase da glicose e da saúde (MARTÍN & RAMOS, 2021).

Condições como a resistência à insulina (RI), característica do DM2, estão associadas com a modulação negativa da via de sinalização da insulina, de forma que a autofosforilação do IR é menos responsiva à ação do hormônio. Isso ocorre uma vez que está favorecida a fosforilação da porção Serina (Ser) do IRS ao invés da porção Tyr, o que resulta na menor interação com o IR. Essa fosforilação, principalmente no OH• dos resíduos de Ser, leva a um aumento em sua eletronegatividade e uma consequentemente alteração radical em sua conformação (SALLES *et al.*, 2019). Além disso, no músculo

esquelético e no TA, a captação de glicose é prejudicada devido à diminuição da atividade de AKT, que leva à diminuição da expressão e translocação de GLUT-4 e, conseqüentemente, menor captação de glicose intracelular e diminuição da síntese de glicogênio no músculo esquelético. Da mesma forma, no tecido hepático a diminuição da atividade de AKT leva à regulação positiva da proteína forkhead box O1 (FOXO1) e à promoção da gliconeogênese, bem como a diminuição da glicogênese (MARTÍN & RAMOS, 2021).

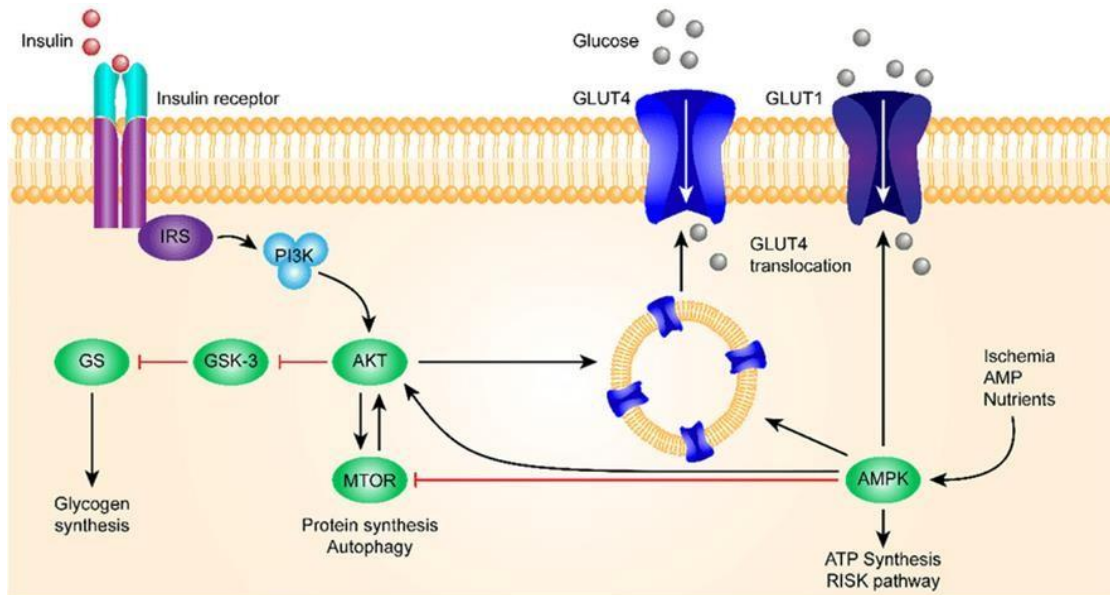


Figura 1: Via de sinalização da insulina iniciada pela ligação da insulina no receptor até a translocação do transportador de glicose (Fonte: Arneth *et al.*, 2019).

Ademais, desordens no metabolismo da insulina também contribuem para alterações no metabolismo lipídico, podendo acometer de 70 a 97% dos indivíduos com DM2. Dentre elas, destaca-se a dislipidemia, estando também associada com o desenvolvimento de DCV e com a redução na expectativa de vida do paciente diabético (VALENÇA *et al.*, 2018; KHUTAMI *et al.*, 2022).

De acordo com a literatura, pacientes com DM2 apresentam uma diminuição na qualidade de vida quando comparados aos que não manifestam a doença. Por se tratar de uma condição crônica e progressiva, o mau controle glicêmico pode acarretar na gradativa debilidade do estado físico, prejuízo na capacidade funcional, dores corporais, entre outras complicações (VALENÇA *et al.*, 2018). Ao contrário do DM1, que não pode ser evitado, o DM2 pode ser retardado ou evitado por meio de modificações do estilo de vida, que incluem alimentação saudável e atividade física (DSBD, 2019). Da mesma forma, os pilares para o controle do DM2 envolvem a promoção de alimentação saudável,

prática de atividades físicas em base regular, abandono do tabagismo e manutenção do peso corporal saudável. Caso as tentativas de alteração no estilo de vida sejam insuficientes no controle da glicemia, a terapia oral medicamentosa é geralmente iniciada, sendo a Metformina (Met) o medicamento de primeira linha, podendo ainda a insulina ser indicada em casos onde medicamentos não-insulínicos não são capazes de atingir o controle glicêmico (IDF, 2021).

3.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como uma condição de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, que excede a capacidade dos sistemas biológicos de eliminar esses produtos reativos (KHUTAMI *et al.*, 2022). Sob condições fisiológicas, o nível de EROs celular é estável em um equilíbrio dinâmico que é modulado por processos celulares que as produzem e eliminam (ZHANG *et al.*, 2016). As EROs contribuem para vários processos fisiológicos, como sistemas de defesa, sinalização celular e síntese de substâncias biológicas. No entanto, as cascatas de produção de EROs no estresse oxidativo levam ao aumento da oxidação de moléculas biológicas, e predispõem ao desenvolvimento de doenças como diabetes, dislipidemia, hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca (KHUTAMI *et al.*, 2022), além de inflamação e envelhecimento (SNEZHINA *et al.*, 2019). Dentre as EROs mais conhecidas estão os radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH\cdot$) e oxigênio singlete, e as espécies classificadas como não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado a partir da redução parcial do hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2016).

As EROs são produzidas fisiologicamente durante as atividades celulares por diferentes estruturas, em especial na mitocôndria pela cadeia transportadora de elétrons, como subproduto ou produto residual do metabolismo oxidativo mitocondrial. Além disso, a produção de EROs pode ser estimulada em resposta celular a agentes estressores como xenobióticos, citocinas e invasão bacteriana (ZHANG *et al.*, 2016). A formação de EROs surge do transporte de elétrons e sua posterior doação para oxigênio molecular (O_2) que resulta na formação do $O_2^{\cdot-}$ (REHMAN & AKASH, 2017). Nesse sentido, as EROs se originam do $O_2^{\cdot-}$ sintetizado em especial pelos complexos

I e III da cadeia transportadora de elétrons e pela ativação das enzimas NADPH oxidases, que são proteínas de membrana cuja função é transferir elétrons através das membranas celulares (KUTHAMI *et al.*, 2022). Além da síntese endógena de EROs, fatores ambientais como poluição do ar, tabagismo (SINGH *et al.*, 2020) e alimentação, representam fontes exógenas que contribuem para a instalação ou agravamento do estresse oxidativo (LIGUORI *et al.*, 2018).

As EROs, estimuladas por fontes endógenas ou exógenas, resultam na modificação oxidativa de cada uma das principais macromoléculas celulares, gerando metabólitos específicos que podem ser usados como marcadores de estresse oxidativo (LIGUORI *et al.*, 2018). Tais marcadores são derivados, em especial, da oxidação de lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA). Nesse sentido, a peroxidação lipídica consiste em danos aos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares que induz alterações na permeabilidade e fluxo iônico das membranas, tendo por consequência alteração do balanço hídrico da célula, quebra da homeostasia do cálcio (Ca^{2+}) e podendo levar à apoptose celular (PETRY *et al.*, 2010).

Dentre os produtos tóxicos originados da oxidação lipídica está o malondialdeído (MDA). Este produto apresenta papel fundamental no processo aterosclerótico, e pode ter sua quantificação através da medida da concentração das TBARS, uma vez que participa da formação deste ácido (SINGH *et al.*, 2022). Em relação à oxidação de proteínas, são utilizados como marcadores de estresse oxidativo os grupamentos tiois (-SH), dentre eles a glutatona (GSH) que atua através da erradicação dos radicais livres e provoca redução nos níveis de H_2O_2 através da ação das enzimas GPx e glutatona S-transferase (GST) (HALIM & HALIM, 2019). Já o dano oxidativo ao DNA resulta em várias lesões mutagênicas, que podem levar a paradas transcricionais ou erros de indução/replicação ou instabilidade genômica, todos fortemente associados à carcinogênese (LIGUORI *et al.*, 2018)

Com o intuito de estabilizar o excesso de EROs e proteger as células e moléculas biológicas contra danos, o organismo possui sistemas de defesa antioxidante, que podem atuar através da ação enzimática ou não enzimática, mediados por micromoléculas, que podem ter origem endógena ou serem adquiridas através da dieta (LIGUORI *et al.*, 2018). Dentro do sistema de defesa

mediado por ações enzimáticas, a enzima SOD catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 e oxigênio. São conhecidas três formas de SOD no organismo: a primeira apresenta Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e está presente no citosol e sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo; a segunda contém Mn^{2+} como centro redox, está presente na mitocôndria e sua atividade aumenta em resposta ao estresse oxidativo e a terceira é conhecida como SOD extracelular. De forma complementar à ação da enzima SOD, a enzima CAT catalisa a depleção redutiva de H_2O_2 em oxigênio e água (PISOSCHI & POP, 2015).

Além disso, o sistema enzimático da enzima GPx catalisa a quebra de H_2O_2 em H_2O e oxigênio pela oxidação da GSH reduzida em dissulfeto de glutationa e redução a GSH pela glutationa redutase (GR) (LIGUORI *et al.*, 2018), de forma que a glutationa opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida (BARREIROS *et al.*, 2006). Dentre os antioxidantes não enzimáticos estão aqueles que podem ter origem endógena, como a bilirrubina, albumina e ácido úrico que estão presentes no sangue, e os de origem exógena que incluem o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno e os antioxidantes fenólicos, que incluem derivados do estilbeno (resveratrol, ácidos fenólicos, e flavonoides), dentre outros (LIGUORI *et al.*, 2018).

De maneira geral, a contribuição do estresse oxidativo para a etiologia de doenças pode ser classificada de duas maneiras: primeiramente, o estresse oxidativo como causa primária da doença e, em segundo lugar, o estresse oxidativo como contribuinte secundário para a progressão da doença (FORMAN & ZHANG, 2021). Especialmente no DM, estudos relacionando o estresse oxidativo com a origem e progressão desta doença já são descritos desde a década de 80 (MATKOVICS *et al.*, 1982). No entanto, os mecanismos subjacentes precisos desta associação ainda não são totalmente compreendidos. Uma das hipóteses relaciona o excesso de EROs no organismo com a desregulação da função biológica de várias proteínas, através da interação como segundos mensageiros a resíduos de cisteína dessas proteínas, que são conhecidos como “sensores redox”. Tal alteração pode ativar vias alternativas de sinalização que desempenham papéis críticos no comprometimento da secreção e resistência à insulina, favorecendo assim o

desenvolvimento de diabetes e complicações diabéticas (ZHANG *et al.*, 2020; HALIM & HALIM, 2019).

3.3 Compostos fenólicos

A investigação de compostos de origem vegetal com eminentes propriedades terapêuticas e efeitos adversos mínimos têm despertado significativa atenção por parte de pesquisadores ao redor do mundo (CHEDEA *et al.*, 2022). Nesse sentido, a partir do final do século XX, com a divulgação de um documento pela OMS estimulando o consumo de frutas e vegetais, esses elementos naturais têm se tornado alvo de crescente interesse em razão das suas propriedades benéficas, tais como atividade antioxidante, anti-obesidade anti-inflamatória, anti-hipertensiva, anti-hiperlipidêmica e capacidade de modular o metabolismo (OMS, 2002; AMIOT, RIVA & VINET, 2016; CHEDEA *et al.*, 2022).

Um grupo relevante de compostos bioativos é representado pelos polifenóis, amplamente encontrados em frutas, vegetais, chás e grãos (PANDEY & RIZVI, 2009) como resposta secundária a agentes estressores como vento e infecções (PEIXOTO *et al.*, 2018). Os polifenóis apresentam uma ampla variedade de estruturas, as quais estão divididas em duas principais classes: flavonoides e não-flavonoides (KANG *et al.*, 2020). Os flavonoides são compostos constituídos por dois anéis fenólicos ligados por um anel pirano e são agrupados de acordo com o grau de oxidação, incluindo as flavonas, flavanonas, antocianinas e proantocianinas. Já os não flavonoides mais documentados são os ácidos fenólicos, estilbenos e lignanos (AMIOT, RIVA & VINET, 2016; KANG *et al.*, 2020).

No presente momento, evidências literárias atribuem efeitos benéficos à saúde humana aos compostos fenólicos, que abrangem desde a prevenção até a desaceleração do desenvolvimento de condições patológicas (CHEDEA *et al.*, 2022). Diante disso, o consumo regular de alimentos ricos nesses compostos vem sendo associado à redução do risco de DCV (AUBEVERAL *et al.*, 2017), câncer e desordens neurodegenerativas, como DA e Parkinson (AMBRIZ-PÉREZ *et al.*, 2016), DM2 e SM (AMIOT, RIVA & VINET, 2016; URQUIAGA *et al.* 2015 e 2018). No que diz respeito ao efeito antioxidante, os polifenóis têm a capacidade de neutralizar e quelar as EROs e modular vias

endógenas de combate ao estresse oxidativo. Essa atividade ocorre por meio da ativação de reguladores importantes da atividade antioxidante e da atividade de enzimas como SOD, CAT, GSH e GPx (DA COSTA *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2020; DUAN *et al.*, 2022).

Todavia, além desses efeitos, diversos outros mecanismos bioquímicos e moleculares têm sido identificados, demonstrando uma ampla gama de ações abrangentes. Esses mecanismos atuam tanto nas vias de sinalização intracelular quanto nas intercelulares, influenciando a regulação de fatores de transcrição nuclear, metabolismo de gorduras e a modulação da síntese de mediadores inflamatórios (YONAMINE *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2020). Além disso, estão associados à regulação da glicose, influenciando a sinalização e secreção de insulina, redução da apoptose, estímulo à proliferação de células beta pancreáticas e atenuação da RI (YONAMINE *et al.*, 2017; AVERILLA *et al.*, 2019; ESEBERI *et al.*, 2022). Logo, os polifenóis apresentam um potencial terapêutico significativo na prevenção e tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, RI e à inflamação, contribuindo para a manutenção da homeostase celular e promovendo a saúde em geral.

3.4 Farinha do bagaço de uvas

As uvas (gênero *Vitis sp.*) representam uma das culturas mais extensivamente cultivadas ao redor do mundo. O consumo moderado de uvas e vinho, em especial tintos, tem sido associado com a redução nas taxas de mortalidade e incidência de DCV. O efeito cardioprotetor da uva e de seus subprodutos está relacionado a sua capacidade de prevenir a agregação plaquetária e modificar o perfil lipídico como resultado da ação dos compostos bioativos presentes em sua composição química. Esse fenômeno, conhecido como “Paradoxo Francês”, associa um alto consumo de vegetais, óleos vegetais, frutos do mar, laticínios e um consumo moderado de vinho tinto, observados nas dietas da população francesa e do mediterrâneo, com as reduzidas taxas de mortalidade por DCV nessas populações (MUNOZ-BERNAL *et al.*, 2021).

De acordo com a Organização Internacional de Videiras e Vinho (OIV) a produção anual global de uvas frescas no ano de 2019 foi de aproximadamente 85 milhões de toneladas (OIV, 2019). No entanto, mais de 50% do total da

produção é destinada para a produção de vinho, cerca de 35% para a mesa dos consumidores e a menor parcela destinada à secagem (MUNOZ-BERNAL *et al.*, 2018). Inúmeras perdas ocorrem como resultado do processamento de alimentos. Os principais subprodutos do processo de vinificação são separados durante as etapas de esmagamento e prensagem das uvas e apenas uma pequena quantidade desses resíduos são valorizados ou aproveitados (JACQUES *et al.*, 2014).

O bagaço de uva (BU) representa aproximadamente de 25 a 35% da massa de uvas destinadas para a produção de suco e vinho (AVERILLA *et al.*, 2019; FRUM *et al.*, 2022). Consiste em cascas, caules, polpas, sementes e outros fragmentos sólidos, assim como leveduras resultantes do processo de fermentação (FRUM *et al.*, 2022). Este subproduto é caracterizado por uma elevada concentração de compostos fenólicos, uma vez que estes não são totalmente extraídos durante o processo de vinificação e permanecem como glicosídeos incorporados na casca, polpa ou semente da uva (HERNÁNDEZ-SALINAS *et al.*, 2015; LÍNGUA *et al.*, 2016; AVERILLA *et al.*, 2019).

De maneira geral, existem dois tipos de BU, tinto e branco, de acordo com as uvas utilizadas no processo de vinificação. A principal diferença entre o vinho tinto e o branco é que o mosto branco é separado do bagaço antes da fermentação. Em contraste, no caso do vinho tinto, a prensagem ocorre apenas após a fermentação. Sendo assim, o BU branco costuma apresentar paladar mais doce, uma vez que seu teor de açúcar é maior, pois não passou pelo processo de fermentação. Ao mesmo tempo, o BU tinto consiste em uma matriz fermentada contendo diferentes concentrações de álcool (CHEDEA *et al.*, 2022). Além destas, variáveis como a variedade, ambiente de plantio e método de processamento podem influenciar a composição do BU (ANTONIC *et al.*, 2020).

De acordo com Gómez-Brandón *et al.* (2019), a produção mundial de BU varia de 10,5 a 13,1 milhões de toneladas anualmente. Embora parte do BU seja utilizado como matéria prima para a produção de destilado viável de uva (conhecida como “grappa”) (OLIVEIRA *et al.*, 2016), como suplemento para a alimentação animal ou como fertilizante para o solo, grande parte deste subproduto é descartada anualmente e sua eliminação provoca preocupações

ambientais, ao mesmo tempo que representa um elevado custo para a indústria (AVERILLA *et al.*, 2019).

No contexto das preocupações ambientais atuais e com a crescente demanda por compostos naturais com potenciais efeitos benéficos à saúde humana, a conversão do BU para uma forma segura e utilizável, visando um aproveitamento integral e gestão sustentável de resíduos ambientais instiga o desenvolvimento de alternativas práticas (AVERILLA *et al.*, 2019). Nesse sentido, a produção de uma farinha do bagaço de uva (FBU) torna-se uma opção viável, uma vez que consiste apenas na secagem e moagem do bagaço e pode ser utilizada para a fabricação de panificados, barras de cereais, massas caseiras, sucos, e incorporada em muitos alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2016; PALMA *et al.* 2020; PALMA *et al.*, 2021)

De maneira geral, as FBU apresentam alto valor nutricional, compostas por abundante concentração de fibras solúveis e insolúveis e compostos bioativos com potencial antioxidante, como compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides e resveratrol (AVERILLA *et al.*, 2019; PALMA *et al.*, 2020). Devido à sua composição química e forte potencial biotecnológico, recentemente, a FBU foi utilizada em estudos que demonstraram suas atividades anti-hiperglicêmica, antioxidante, anti-inflamatória e anti-ateroesclerótica em modelos animais de SM (HERNÁNDEZ-SALINAS *et al.*, 2015), obesidade (CHARRADI *et al.*, 2017) e aterosclerose (RIVERA *et al.*, 2019).

As espécies de *Vitis vinifera* incluem uvas viníferas, das quais a *Vitis vinifera* 'Touriga Nacional' e a *Vitis vinifera* 'Arinto' são exemplos de cultivares/variedades tintas e brancas, respectivamente (Figura 2) (CABRITA *et al.*, 2006). A Touriga Nacional é considerada uma das melhores castas portuguesas de vinho tinto devido, sobretudo, ao seu aroma particular (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Esta variedade é caracterizada por aromas frutados e doces com notas cítricas, evocando bergamota (*Citrus bergamia*) e aromas florais, como esteva e violeta (PINHO *et al.* 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, o aroma dos vinhos da casta Touriga Nacional se deve, principalmente, à composição de seus terpenóides (PINHO *et al.*, 2007).

Já o perfil clássico das uvas da casta Arinto tende a originar vinhos pálidos, aromáticos, com tonalidade verde e excelente acidez (TRALHÃO, 2015). Dados da literatura revelam que as FBU provenientes destas duas

castas apresentaram boa aceitação entre participantes de estudos sensoriais que as utilizaram como ingredientes para a confecção de produtos de panificação (PALMA *et al.* 2020; PALMA *et al.*, 2021). Em relação à composição química destas variedades, estudos apontam uma elevada atividade antioxidante geral ligada à concentração de compostos bioativos das mesmas. Dentre estes compostos destacam-se o conteúdo fenólico total, antocianinas, ácido gálico, ácidos hidroxicinâmicos, procianidina B1 e ácidos hidroxibenzoicos (CORREIA & JORDÃO, 2015; TRALHÃO, 2015; MOREIRA *et al.*, 2018).

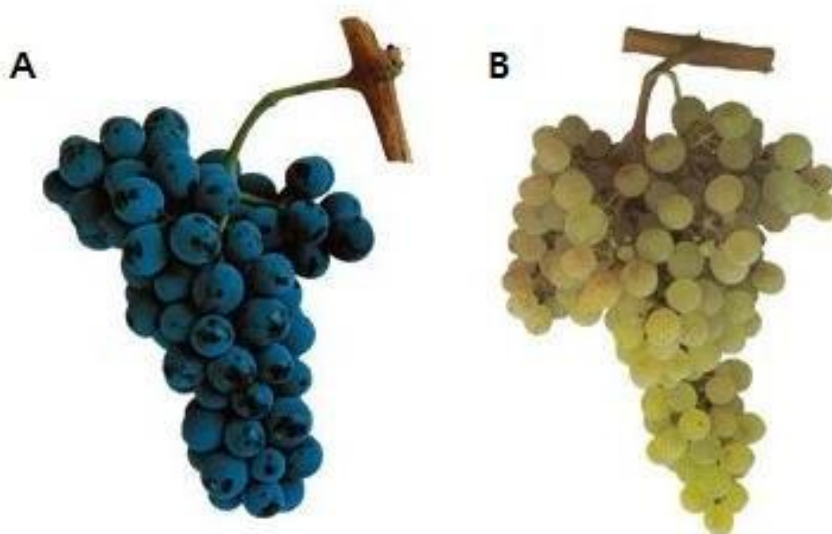


Figura 2: *Vitis vinifera* 'Touriga Nacional' (A) e *Vitis vinifera* 'Arinto' (B)

Fonte: Wikipédia

4. Materiais e Métodos

4.1 Obtenção das farinhas do bagaço de uvas

As amostras de BU das variedades 'Arinto' e 'Touriga Nacional' foram fornecidas pela Adega Cooperativa Carmim, do município de Reguengos de Monsaraz, região do Alentejo, Portugal. Após o recebimento, as amostras foram secas em estufa (J.P. Selecta, Barcelona, Espanha), durante 24h a 60°C, moídas em um triturador de lâminas doméstico (Moulinex, Alencon, França) para obtenção das farinhas e, por fim, armazenadas em sacos de propileno devidamente selados até o momento de utilização. Os sacos contendo as FBU foram transportados para o Brasil em condições adequadas e conservados ao

abrigo de luz, calor e umidade até o momento da confecção das dietas experimentais.

4.2 Dieta experimental para indução de DM2

A dieta hiperlipídica (DHL) foi confeccionada artesanalmente de acordo com Oliveira *et al.* (2022) (Tabela 1). Todos os ingredientes em pó foram misturados em um Multiprocessador de alimentos (Mondial, Conceição do Jacuípe, Bahia). Na sequência, o óleo, a banha e a água foram adicionados e processados até a obtenção de uma mistura homogênea. Por fim, a massa foi moldada no formato de *pellets* (aproximadamente 18 - 20mm) e levados a estufa (Solab, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil) a 60°C por 24h. As dietas com acréscimo de FBUT e FBUB receberam um acréscimo de 10% destas farinhas (KIM *et al.*, 2014), que foram adicionadas na mistura e homogeneizadas no processador até obtenção de uma mistura homogênea que, posteriormente foi moldada em forma de *pellets* e levada à estufa a 60°C por 24h. A dieta controle normolipídica oferecida foi a Ração Para Ratos E Camundongos Autoclavável da marca Socil®, disponível no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. De acordo com o fabricante a mesma apresenta os seguintes percentuais: umidade: 12,5, proteína bruta: 23, extrato etéreo: 4, matéria mineral: 9, fibra bruta: 5, cálcio – mín (g/kg): 12, cálcio – máx (g/kg): 13 e fósforo - mín (g/kg): 8,5.

Tabela 1. Composição da dieta hiperlipídica utilizada no protocolo experimental para indução de DM2. Fonte: adaptada de Oliveira e colaboradores (2022).

Ingredientes (g ou ml/kg)	
Albumina – naturovos®	200
Amido solúvel P.A. – ACS – Dinâmica Química Contemporânea LTDA®	130
Celulose microcristalina P.A. - Synth®	50
Amido de milho – Bom gosto®	210
Frutose (LEVULOSE) P.A. – êxodo científica®	63
Óleo de soja - vitaliv®	50
Banha de porco - Excelsior®	100
TBHQ - QUALIPRO®	0,0014
Bitartarato de colina – vida nova®	2,50

L-Cistina P.A. – Dinâmica Química Contemporânea LTDA®	3,0
Mix vitamínico AIN-93 - RHOSTER®	10
Mix Mineral AIN-93G - RHOSTER®	40
Sacarose - docesucar®	147
Água	200

4.3 Composição centesimal das dietas experimentais

Para a composição centesimal das dietas experimentais foi determinado o teor de umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios e fibra bruta, conforme a metodologia descrita pela AOAC International (2006). O teor de carboidratos foi determinado pela diferença entre a soma dos conteúdos de umidade, cinzas, proteína, lipídios e fibra de 100% (ZAMBIAZI, 2010).

4.4 Animais e aspectos éticos

Para o protocolo experimental foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando entre $403,3 \pm 34$ g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram alojados em gaiolas com as seguintes características: medidas P65cmxL25cmxA15cm, feitas de polipropileno com tampa em arame galvanizado, com bebedouro em polipropileno com capacidade de 700 mL, rolha cônica de borracha e bico de aço inoxidável reto. O assoalho foi coberto por maravalha. As gaiolas continham no máximo 3 animais, sob condições apropriadas, como temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de 12h claro/escuro, livre acesso à ração e água.

Os cuidados com os animais seguiram a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – CONCEA e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituição (CEUA 033578/2022-14).

4.5 Protocolo experimental de DM2

Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

Grupo Controle (CT): Dieta controle (Dieta comercial padrão, normolipídica)

Grupo DM2 (DM2): DHL por 21 dias + dose única via intraperitoneal (i.p.) de STZ (35 mg/kg) no 21º dia

Grupo DM2 + Metformina 250 mg/kg (DM2+Met): DHL (21 dias) + dose única via intraperitoneal (i.p.) de STZ (35 mg/kg) no 21º dia + Met (250 mg/kg) via intragástrica (i.g.) uma vez ao dia

Grupo DM2 + Farinha de uva branca 10% (FBUB): DHL+ FBUB 10% (21 dias) + dose única via intraperitoneal (i.p.) de STZ (35 mg/kg) no 21º dia

Grupo DM2 + Farinha de uva tinta 10% (FBUT): DHL+ FBUT 10% (21 dias) + dose única via intraperitoneal (i.p.) de STZ (35 mg/kg) no 21º dia

A STZ (35 mg/kg) foi dissolvida em solução de citrato de sódio 0,01M (SRINIVASAN *et al.*, 2005). Durante todo o período experimental os animais receberam veículo (água destilada) ou Met (250 mg/kg) por via intragástrica, não excedendo 0,1 mL/100g de peso corporal (JIAO *et al.*, 2017). A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para acompanhamento do ganho de peso, e a ingestão alimentar e hídrica foi avaliada diariamente a partir da pesagem de ração e medida da água, respectivamente.

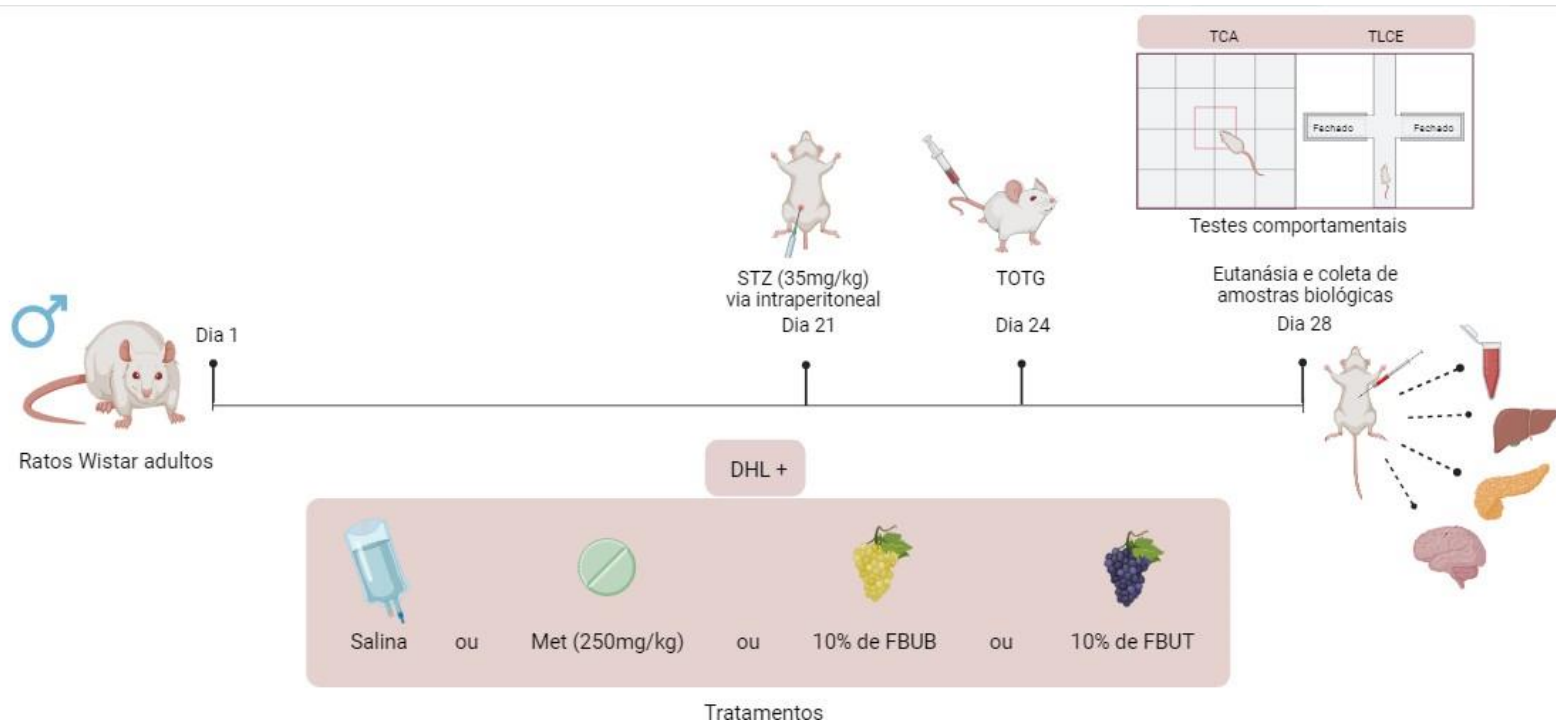


Figura 3: Representação do protocolo experimental de DM2. DHL: dieta hiperlipídica, FBUB: farinha do bagaço de uva branca, FBUT: farinha do bagaço de uva tinta, Met: metformina, STZ: estreptozotocina, TCA: teste do campo aberto. TLCE: teste do labirinto em cruz elevado, TOTG: teste de tolerância oral à glicose.

4.6 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Após 72h da administração de STZ e 6h de jejum, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) nos animais submetidos ao modelo experimental de DM2. Esse teste consiste na monitoração da glicemia, utilizando glicosímetro (AccuChek Guide, Roche Diagnostics®, USA) nos tempos 0, 30, 60 e 120 min após administração por via intragástrica de solução de D-glicose a 50% (2 g/kg). As amostras de sangue venoso foram obtidas através de uma pequena punção na cauda dos animais (JIAO *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2023).

4.7 Parâmetros comportamentais

Teste do campo aberto (TCA): Foi realizado para a avaliação da atividade exploratória e locomotora dos animais seguindo o modelo de GAZAL e colaboradores (2015). Em resumo, o aparato consiste em uma caixa com o chão da arena dividida em 16 quadrados iguais. Os animais foram colocados no quadrado traseiro esquerdo e puderam explorar livremente a caixa durante 5 minutos, período durante o qual o número de quadrados cruzados com todas as patas (cruzamento) e de levantamentos foi contado.

Teste do labirinto em cruz elevado (TLCE): Tem como objetivo avaliar a ansiedade em roedores e foi realizado conforme descrito por PELLOW e colaboradores (1985). O aparato consiste em dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) e dois braços fechados opostos (50 x 10 x 40 cm) voltados para uma plataforma central (10 x 10 cm) elevado a 50 cm do chão. Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato, voltado para um dos braços abertos. A frequência de entradas nos braços abertos ou fechados, o tempo gasto em cada tipo de braço e o número de entradas foram medidos por 5 minutos.

Os testes comportamentais foram realizados nas dependências do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, sob condições ambientais controladas, como temperatura, umidade e intensidade de luz. A fim de eliminar pistas olfativas, tanto o aparato do campo aberto quanto o labirinto foram sistematicamente limpos durante a realização dos testes.

4.8 Eutanásia e obtenção de amostras biológicas

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com Isoflurano, seguido por exsanguinação por punção cardíaca e guilhotinamento, conforme Resolução Normativa N° 12, de 20 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. A eutanásia ocorreu no Laboratório Neurocan - Prédio 29 (CCQFA), e o procedimento foi realizado em sala separada dos demais animais, minimizando o estresse.

No momento da eutanásia o sangue foi coletado e centrifugado para separação do soro, que foi utilizado para posteriores análises bioquímicas. O córtex cerebral e hipocampo, bem como o fígado foram separados e armazenados a -80°C para utilização em posteriores análises bioquímicas.

Os pâncreas foram coletados, pesados, fixados em formalina tamponada 10 % (pH 7,4) e incluídos em parafina. Após, foram realizados cortes histológicos de 5 µm, para a preparação das lâminas que foram coradas com hematoxilina/eosina para a análise histopatológica. As amostras para a análise da adiposidade corporal também foram realizadas ao final do experimento pós eutanásia dos animais, através de dissecação e pesagem do TA visceral.

4.9 Dosagens bioquímicas

Foram realizadas dosagens séricas de glicose, CT, TG, HDL, ácido úrico, ureia, creatinina, proteína e as transaminases ALT e AST através de método enzimático colorimétrico, utilizando kits comerciais fornecidos pela Labtest® (Labtest, MG, Brasil) e BioClin® (BioCLin, MG, Brasil). O índice de triacilglicerol-glicose em jejum (índice TyG) foi calculado pela fórmula $[\text{Triacilglicerol (mg/dL)} \times \text{Glicose (mg/dL)}] / 2$ (ZHAO *et al.*, 2022).

4.10 Avaliação de marcadores de estresse oxidativo

Para realização destes testes foram utilizadas amostras de fígado, hipocampo e córtex cerebral. Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20 mM, contendo 140 mM de KCl (pH 7,4), centrifugados a 3500 rpm por 5 min, e o sobrenadante coletado para a realização das análises abaixo mencionadas. A concentração de proteína foi determinada pelos métodos de LOWRY e colaboradores (1951) ou BRADFORD (1976), quando

pertinente.

Espécies reativas de oxigênio: A mensuração dos níveis de EROs foi realizada pelo método de ALI e colaboradores (1992), onde a emissão de intensidade de fluorescência da 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) é registrada a 525 e 488 nm de excitação 30 min após a adição de 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) ao meio. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol DCF/mg}$ de proteína.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): A mensuração dos níveis de TBARS foi realizada pelo método de OHKAWA e colaboradores (1979). Brevemente, foram adicionados aos homogeneizados o ácido tricloroacético 10% e TBA 0,67%, e, em seguida, estes foram colocados em banho-maria à 100°C por 30 min. Após 10 min em refrigerador (4°C) as absorbâncias foram analisadas em espectrofotômetro a 535 nm e os resultados expressos como nmol TBARS/mg de proteína.

Conteúdo tiólico total: A medida dos níveis de tióis totais foi realizada pelo método de AKSENOV e MARKESBERY (2001). De modo geral, tampão PBS contendo 1mM de EDTA, pH 7,4, foi adicionado aos homogeneizados e a reação iniciou pela adição da solução de DTNB 10 mM. Após 60 min de incubação à temperatura ambiente e no escuro, as absorbâncias foram medidas a 412 nm e os resultados expressos como nmol TNB/mg de proteína.

Nitritos: A medida foi realizada usando a reação Griess conforme descrito por STHUER e NATHAN (1989). Os homogeneizados (50 μL) reagiram com 50 μL de Griess (1% de sulfanilamida, 1% de cloreto de naftiletilenodiamina e 25% de H_3PO_4) durante 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 540 nm. A quantidade de nitrito foi comparada com uma curva padrão de concentrações conhecidas de nitrato de sódio.

Atividade das enzimas antioxidantes: A atividade da enzima SOD foi avaliada conforme método descrito por MISRA e FRIDOVICH (1972), baseada na autooxidação da adrenalina que é altamente dependente de oxigênio. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da autooxidação de adrenalina e a atividade específica foi expressa como unidades (U)/mg de proteína. A atividade da enzima CAT foi determinada de acordo com o método de AEBI (1984), onde o desaparecimento de H_2O_2 foi monitorado continuamente em espectrofotômetro a 240 nm por 90 segundos.

Uma unidade da enzima é definida como 1 mmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica foi relatada como U/mg de proteína.

4.11 Análise estatística

A análise estatística do TOTG e da curva de ganho de peso foi realizada por Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. A análise dos outros parâmetros foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, utilizando o *software* estatístico GraphPad PRISM 8.0.2. Os dados experimentais foram demonstrados como média \pm erro padrão e com nível mínimo de significância aceito de $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Composição centesimal das rações experimentais

A Tabela 2 demonstra os resultados referentes à análise da composição centesimal das dietas experimentais administradas aos animais durante o protocolo de indução experimental de DM2. Nesse sentido, é possível observar que as dietas suplementadas com FBUB e FBUT apresentaram maior teor de umidade quando comparadas a DHL padrão ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente). Ademais, o acréscimo de FBUT resultou em um menor teor de cinzas quando comparados a formulação não enriquecida com FBU ($P < 0,05$). Em relação a composição centesimal de lipídios das dietas experimentais, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras ($P > 0,05$). Além disso, a partir da adição de FBUB observou-se um menor percentual de proteínas na composição total da ração ($P < 0,05$). Em relação a composição de fibra bruta, não foi possível detectá-la na amostra de ração da DHL, sugerindo que a mesma não a apresenta em sua composição, enquanto que nas formulações suplementadas com FBUB e FBUT foram detectados teores de fibra bruta (0,44 e 0,66%, respectivamente). Em relação ao percentual de carboidratos calculado a partir da diferença dos outros constituintes do total de 100%, foi possível observar que a FBUB apresentou o maior teor deste macronutriente, seguida pela DHL e FBUT. Por fim, a respeito do valor calórico das rações em 20g foi possível observar maior densidade calórica na ração DHL, seguida por FBUB e FBUT.

Tabela 2: Composição centesimal e valor calórico das dietas experimentais

Determinações	DHL	DHL + 10% de FBUB	DHL + 10% de FBUT
Umidade (%)	13,04±0,19	12,09±0,16**	14,83±0,21***
Cinzas (%)	3,83±0,21	3,53±0,01	3,07±0,45*
Lipídios (%)	15,95±0,07	14,91±0,52	14,79±2,83
Proteínas (%)	10,93±0,25	10,04±0,04*	10,87±0,01
Fibra bruta (%)	ND	0,44±0,01	0,66±0,01
Carboidratos totais (%) #	56,25	58,99	55,78
Valor calórico (Kcal) ##	82,5	82,1	79,9

Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão. *** representa $P < 0,001$, ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado a formulação DHL. # Calculado por diferença entre a soma de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas, subtraindo-se de 100. ## Valor energético correspondente a uma porção de 20g. DHL, dieta hiperlipídica, FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, ND, não detectado.

5.2. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado para avaliar a tolerância à glicose. A Figura 4A mostra que a administração de DHL em conjunto com a injeção intraperitoneal de STZ foi capaz de aumentar significativamente a glicemia basal de todos os grupos diabéticos ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo CT. Por outro lado, o tratamento com Metformina demonstrou efeito protetor frente ao aumento da concentração sérica de glicose no grupo DM2+Met quando comparado ao grupo DM2 ($P < 0,01$). Em relação aos tempos 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga oral de glicose (2g/kg), foi possível observar um aumento significativo da glicemia nos grupos DM2, DM2+Met, FBUB e FBUT quando comparados ao grupo CT ($P < 0,001$), de forma que os tratamentos não foram capazes de mitigar este efeito. Além disso, foi possível observar que o grupo tratado com Met apresentou diminuição dos valores de glicose comparado ao grupo DM2 nos tempos 30, 60 e 120 minutos ($P < 0,001$, $P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente). De maneira complementar, a partir da análise da área sob a curva (A.U.C), demonstrada na Figura 4B, foi possível observar a intolerância a glicose apresentada pelo grupo DM2 em comparação com o grupo CT

($P < 0,001$) e a proteção frente a esta a partir da administração de Met ($P < 0,01$). Ainda assim, o grupo DM2+Met apresentou valores de A.U.C significativamente superiores aos encontrados no grupo CT ($P < 0,001$). De maneira semelhante ao observado na Figura 4A, foi possível observar ainda que os tratamentos com FBUB e FBUT não foram capazes de proteger frente à intolerância à glicose desafiada pelo TOTG, demonstrando valores significativamente superiores quando comparados ao CT ($P < 0,001$). Entretanto, foi possível observar uma diminuição significativa nos valores de A.U.C. no grupo FBUB quando comparado ao grupo DM2 ($P < 0,05$).

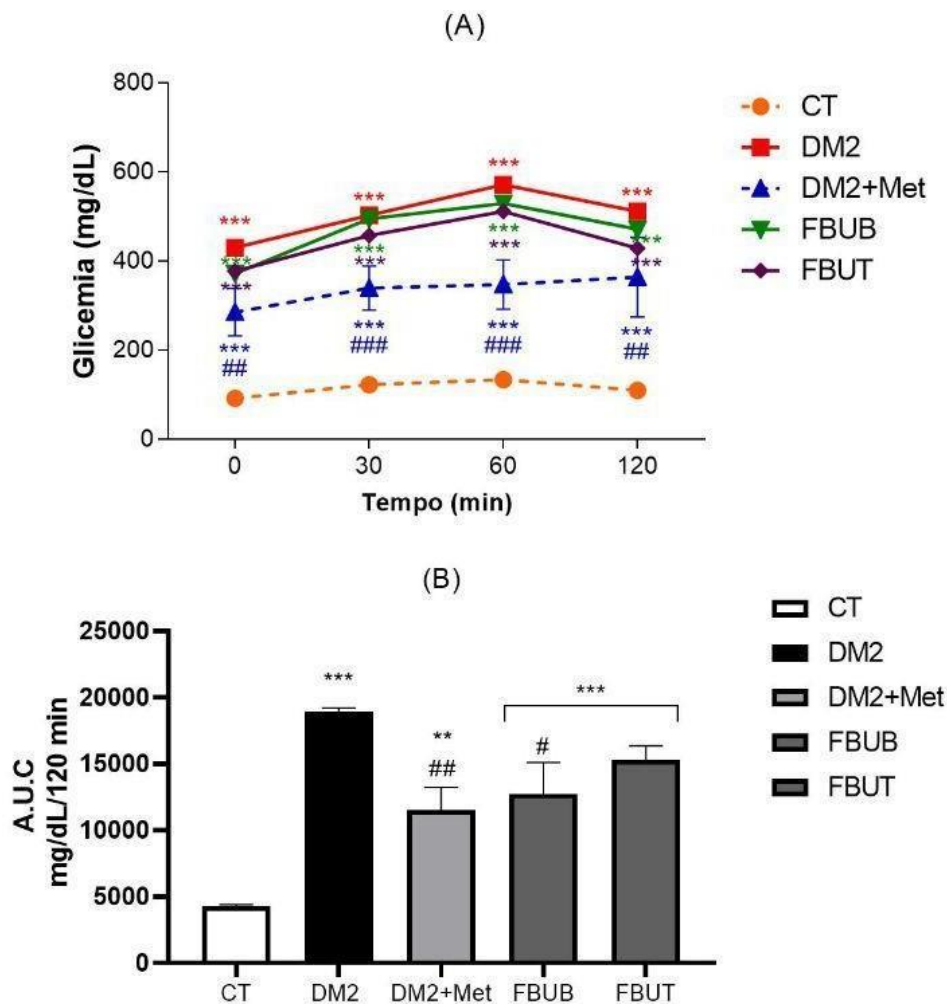


Figura 4: Teste oral de tolerância à glicose demonstrando a variação da glicemia em jejum e após 30, 60 e 120 minutos de sobrecarga oral de glicose (A) e área sob a curva (B). Os resultados estão expressos como média \pm E.P. ($n = 6-10$). *** representa $P < 0,001$, ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. ### representa $P < 0,001$, ## representa $P < 0,01$ e # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2.

ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. A.U.C., área sob a curva, CT, controle; DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina.

5.3. Parâmetros metabólicos

A Tabela 3 mostra dados referentes ao consumo de ração e água, estimativa de ganho de peso total (absoluto e relativo) de pâncreas e tecido adiposo visceral dos animais durante as quatro semanas de experimento. Nesse sentido, é possível observar que o consumo médio de ração em gramas foi significativamente inferior nos grupos DM2+Met e FBUT quando comparados com o grupo CT ($P<0,001$ e $P<0,01$, respectivamente) e superior no FBUB quando comparado ao grupo DM2 ($P<0,05$) no período pré STZ ou salina. Ademais, a respeito da ingestão hídrica, foi possível observar uma redução significativa de consumo nos grupos DM2+Met e FBUT, quando comparados ao grupo CT ($P<0,001$ e $P<0,05$, respectivamente). Em relação ao ganho de peso total no período pré STZ ou salina, foi possível observar um aumento significativo apenas nos grupos DM2 e FBUB quando comparados ao grupo CT ($P<0,05$).

Após a administração intraperitoneal de STZ ou salina foi possível observar uma redução significativa no consumo de ração em gramas nos grupos DM2+Met, FBUB e FBUT, quando comparados ao grupo CT ($P<0,01$). Além disso, a respeito da ingestão hídrica, foi possível observar um aumento significativo nos grupos DM2, FBUB e FBUT quando comparados ao grupo controle ($P<0,001$, $P<0,05$ e $P<0,05$, respectivamente) e uma redução significativa do consumo de água no grupo DM2+Met quando comparado ao grupo DM2 ($P<0,05$). Quanto ao ganho de peso total em gramas e peso relativo do pâncreas, ao final do experimento, não foi possível observar diferenças significativas entre nenhum dos grupos experimentais avaliados ($P>0,05$). Já os resultados referentes ao ganho de peso relativo de TA visceral demonstraram aumento significativo deste parâmetro no grupo FBUB quando comparado ao grupo CT ($P<0,05$).

Tabela 3: Efeito da administração de dieta hiperlipídica e STZ e tratamento com Met e FBUB ou FBUT no consumo alimentar, ingestão hídrica, ganho de peso total, peso relativo do pâncreas e tecido adiposo.

	CT	DM2	DM2+Met	FBUB	FBUT
Pré STZ ou salina					
Consumo alimentar (g/dia)	25,76±0,67	21,35±1,46	18,48±0,92***	23,93±1,12#	20,36±1,09**
Ingestão hídrica (ml/dia)	46,53±2,14	41,33±2,87	32,25±1,43**	39,90±2,29	35,97±2,51*
Ganho de peso total (g)	31,44±3,07	50,67±6,06*	34,80±6,78	48,50±4,95*	44,44±2,87
Pós STZ ou salina					
Consumo alimentar (g/dia)	25,06±0,46	20,46±2,72	15,67±1,63**	16,69±1,23**	17,58±1,20**
Ingestão hídrica (ml/dia)	48,80±1,45	107,83±15,38***	67,3±9,51#	80,66±7,04*	83,67±5,96*
Ganho de peso total (g)	28,56±4,38	16,25±3,46	19,33±2,59	19,75±4,19	13,95±4,99
Peso relativo do pâncreas	0,41±0,03	0,37±0,02	0,31±0,02	0,37±0,04	0,33±0,03
Peso relativo do tecido adiposo	11,05±0,80	15,05±1,17	15,20±1,99	16,97±1,91*	13,43±1,17

Os dados estão representados como média ± E.P. (n =6-10). *** representa $P < 0,001$, ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. CT, controle; DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca; FBUT, farinha do bagaço de uva tinta; Met, metformina.

A Figura 5 apresenta os dados referentes à curva de variação de peso semanal dos animais. Nesse sentido, é possível observar que o peso inicial dos animais do grupo DM2+Met foi significativamente superior aos do grupo CT ($P < 0,01$). Além disso, destaca-se um crescente e significativo maior peso corporal dos grupos DM2, DM2+Met e FBUB quando comparados ao CT na primeira ($P < 0,05$, $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente), segunda ($P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente) e terceira ($P < 0,05$, $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente) semanas do período experimental. Por fim, é possível observar uma expressiva diminuição no peso corporal absoluto de todos os grupos diabéticos após a administração da injeção intraperitoneal de STZ no 21º dia de protocolo experimental, de modo que ao final das 4 semanas de experimento não foram observadas diferenças significativas entre os pesos corporais de nenhum dos grupos experimentais ($P > 0,05$).

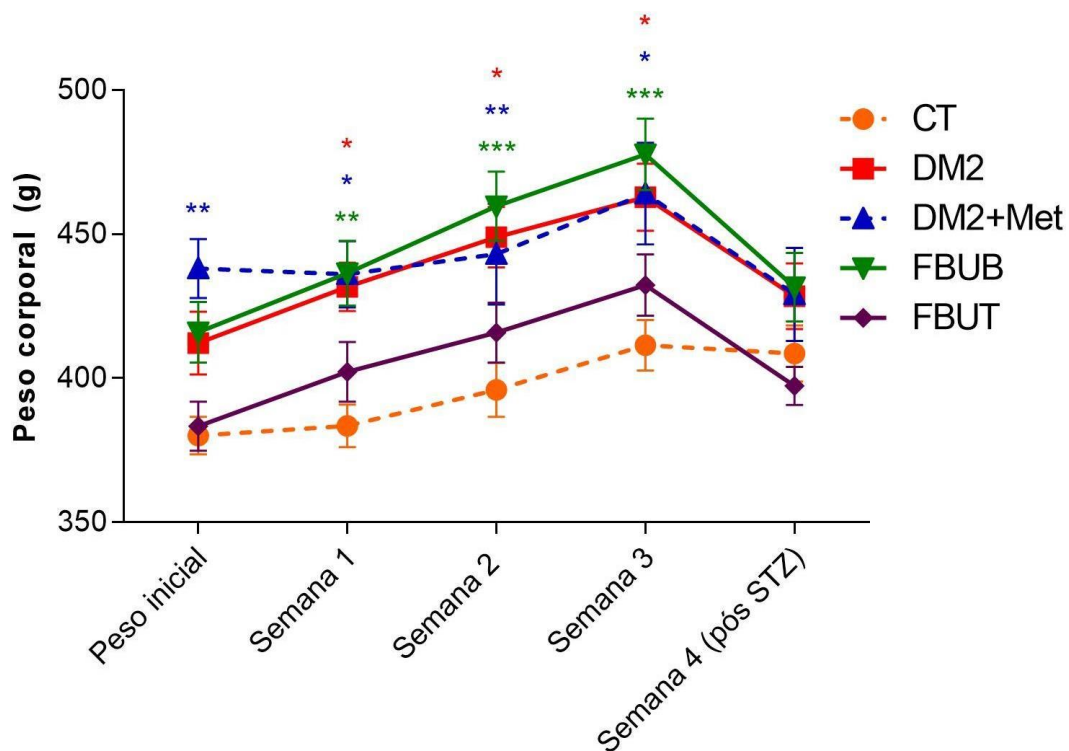


Figura 5: Ganho de peso absoluto semanal ao longo de três semanas de consumo de dieta normolipídica, DHL, DHL suplementada com FBUB ou DHL suplementada com FBUT e perda de peso após administração de STZ. Os resultados estão expressos como média \pm E.P. ($n = 6-10$). *** representa $P < 0,001$ ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. CT, controle; DM2, Diabetes Mellitus tipo

2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina.

5.4. Parâmetros bioquímicos séricos

Quanto aos parâmetros bioquímicos séricos foi possível observar que o protocolo experimental de DM2 induzido pela DHL + STZ aumentou significativamente a glicemia dos todos os grupos avaliados (DM2, DM2+Met, FBUB e FBUT) quando comparados ao grupo CT ($P<0,001$). Por outro lado, o tratamento com Met, FBUB ou FBUT foram capazes de atenuar a alteração glicêmica induzida pela DHL + STZ ($P<0,05$, $P<0,01$ e $P<0,05$, respectivamente) (Figura 6A). Em relação aos níveis séricos de TG, pode-se observar que o grupo DM2 apresentou resultados significativamente superiores aos encontrados no grupo CT ($P<0,001$). Por outro lado, o tratamento com Met, FBUB ou FBUT foram capazes de prevenir o aumento dos TG induzido pela DHL + STZ, ou seja, preveniram a hipertrigliceridemia ($P<0,001$), embora os níveis de TG nos grupos FBUB e FBUT foram significativamente superiores aos do grupo CT ($P<0,05$) (Figura 6B). Ademais, foi observado significativo aumento nos níveis de colesterol total sérico no grupo DM2 quando comparado ao grupo CT ($P<0,01$) (Figura 6C), que não foi observado nos demais grupos. Em relação aos valores séricos de HDL, foi possível observar que a administração de DHL suplementada em 10% com FBUT foi capaz de aumentar significativamente a concentração desta lipoproteína quando comparado ao grupo CT ($P<0,05$).

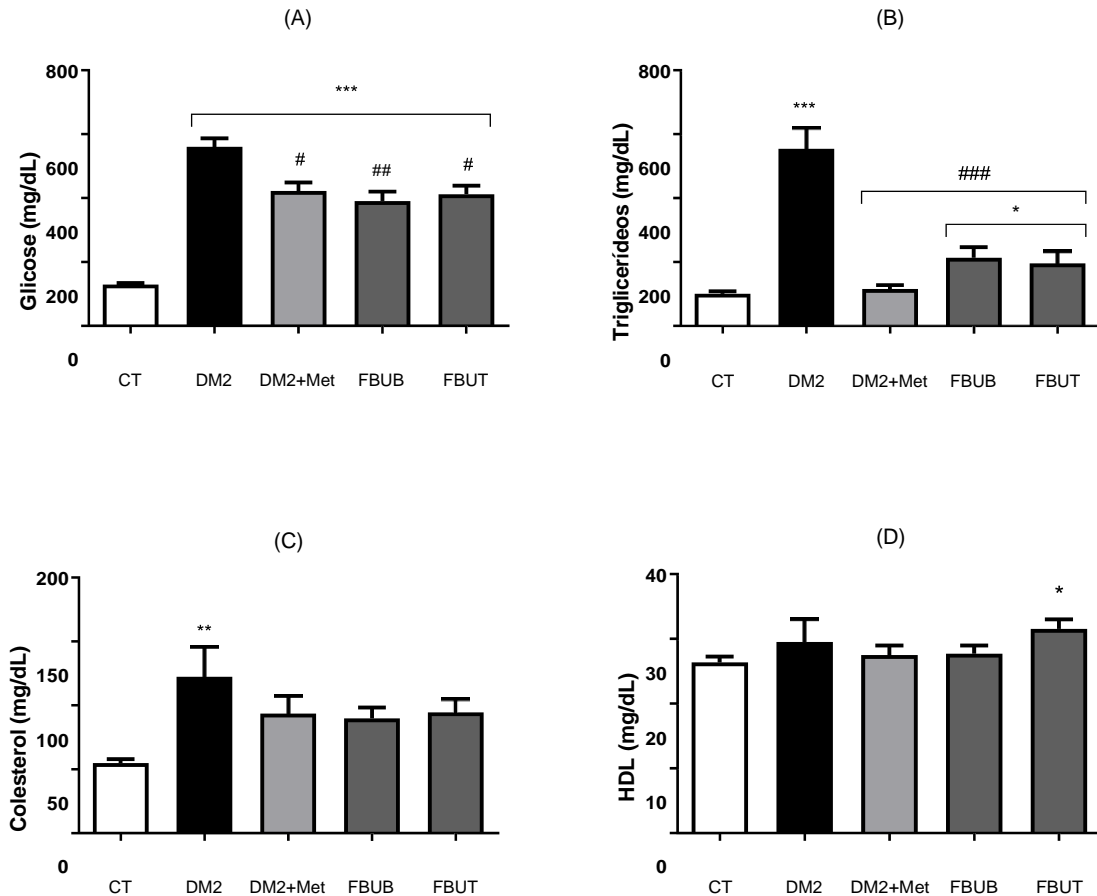


Figura 6: Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta nos níveis séricos de glicose (A), triglicérides (B), colesterol total (C) e colesterol HDL (D) em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2. Os dados estão representados como média \pm E.P. ($n = 4-7$). *** representa $P < 0,001$, ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. ### representa $P < 0,001$, ## representa $P < 0,01$ e # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. CT, controle; DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, HDL, lipoproteína de alta densidade, Met, metformina.

Na Figura 7 está demonstrada a avaliação do índice TyG. Nesse sentido, foi possível observar que a administração de DHL + STZ foi capaz de aumentar significativamente este parâmetro em todos os grupos diabéticos (DM2, $P < 0,001$, DM2+Met, $P < 0,05$, FBUB, $P < 0,001$ e FBUT, $P < 0,001$). Por outro lado, os tratamentos com Met, FBUB ou FBUT foram eficazes em prevenir este aumento quando comparados ao grupo DM2 ($P < 0,001$, $P < 0,05$ e $P < 0,05$, respectivamente).

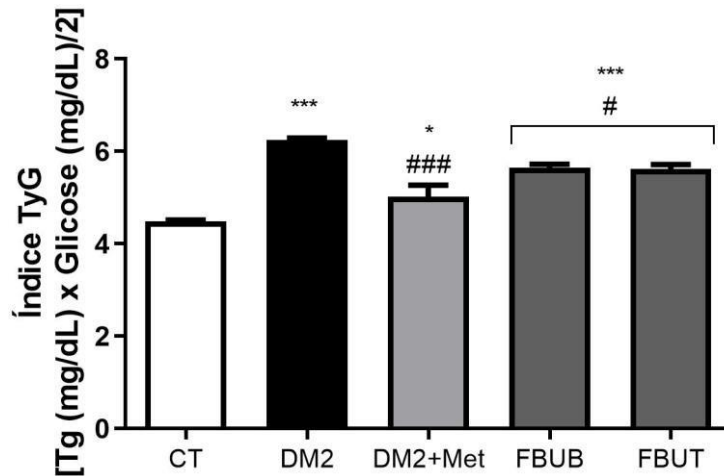


Figura 7: Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta no Índice Triglicérido x Glicose em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2. Os dados estão representados como média \pm E.P. ($n=4-7$). *** representa $P < 0,001$, ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. ### representa $P < 0,001$, ## representa $P < 0,01$ e # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. CT, controle; DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina, TG, triglicédeos, TyG, triglicérido-glicose.

Na Figura 8 estão apresentados os resultados referentes aos níveis séricos de marcadores de dano hepático e renal. Nesse sentido, é possível observar uma redução significativa na concentração de ácido úrico nos grupos DM2+Met, FBUB e FBUT quando comparados ao grupo CT ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) (Figura 8A). Em relação a atividade das enzimas transaminases, observou-se uma redução significativa na atividade da AST no grupo FBUB quando comparado aos grupos CT e DM2 ($P < 0,01$) (Figura 8E) e um aumento significativo na atividade sérica da ALT no grupo DM2 em relação ao CT ($P < 0,05$), enquanto que os tratamentos com FBUB ou FBUT foram capazes de mitigar esta alteração significativamente ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) (Figura 8F). Também foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de creatinina no grupo DM2 não tratado quando comparado ao grupo CT ($P < 0,05$) (Figura 8C). Outros parâmetros avaliados, como concentração de ureia (Figura 8B) e níveis séricos de proteína (Figura 8D) não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$).

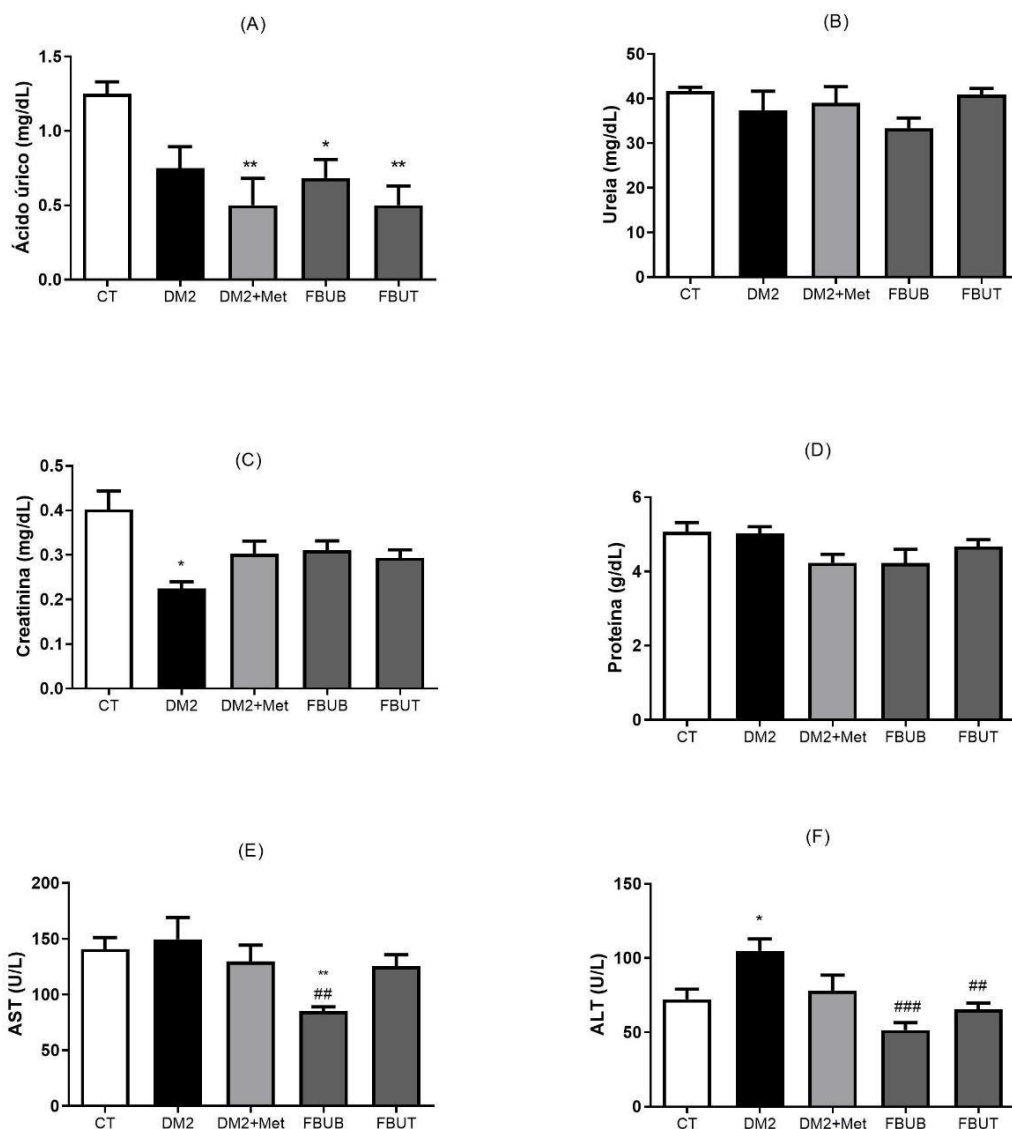


Figura 8: Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta nos níveis séricos de ácido úrico (A), ureia (B), creatinina (C), proteína (D), atividade das transaminases AST (E) e ALT (F) em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2. Os dados estão representados como média \pm E.P. ($n = 4-7$). *** representa $P < 0,001$, ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. ### representa $P < 0,001$, ## representa $P < 0,01$ e # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. ALT, alanina aminotransferase, AST, aspartato aminotransferase, CT, controle; DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina.

5.5. Parâmetros comportamentais

A Figura 9 mostra a influência dos tratamentos no número de cruzamentos totais (Figura 9A) e levantamentos (Figura 9B) dos animais no teste do campo aberto, onde se observou que os tratamentos não causaram diferenças significativas ($P > 0,05$) no número de cruzamentos totais e levantamento no

teste do campo aberto em nenhum dos grupos experimentais (Figura 9A e 9B, respectivamente).

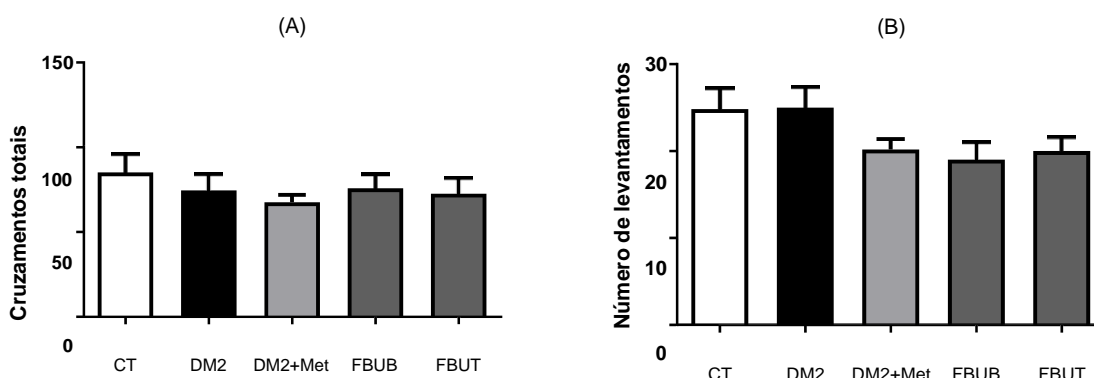


Figura 9: Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta no Teste do Campo Aberto, referente aos cruzamentos totais (A) e número de levantamentos (B) em ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2. Os dados estão representados como média ± E.P. (n =6-10). ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. CT, controle; DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina.

A Figura 10 ilustra os efeitos dos tratamentos nos parâmetros comportamentais relacionados ao teste do labirinto em cruz elevado quanto ao percentual de entradas no braço aberto (Figura 10A) e de tempo despendido no braço aberto (Figura 10B). Nesse sentido, foi possível observar uma diminuição significativa no percentual de tempo gasto no braço aberto no grupo DM2 ($P<0,05$) quando comparado ao grupo CT, bem como o aumento significativo no percentual de tempo gasto no braço aberto nos grupos tratados com FBUB e FBUT quando comparados ao grupo DM2 ($P<0,05$ e $P<0,001$, respectivamente) (Figura 10B).

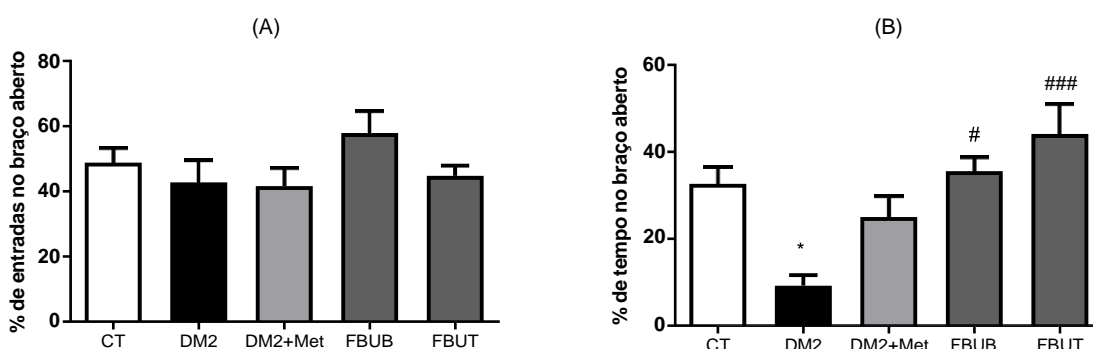


Figura 10: Efeitos do tratamento com Metformina e farinha do bagaço de uva branca ou tinta no Labirinto em Cruz Elevado, referente ao % de entradas no braço aberto (A) e % de tempo no

braço aberto (B) de ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes *Mellitus* tipo 2. Os dados estão representados como média \pm E.P. (n =6-10). * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. ### representa $P < 0,001$, ## representa $P < 0,01$ e # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. CT, controle; DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina.

5.6 Parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo

A Tabela 4 demonstra os parâmetros de estresse oxidativo avaliados em córtex e hipocampo de ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de DM2 por administração de DHL + STZ e tratados com Met, FBUB ou FBUT. Nesse sentido, em relação à avaliação em córtex cerebral, foi possível observar que os tratamentos com Met, FBUB ou FBUT aumentaram significativamente a concentração de conteúdo tiólico total quando comparados ao grupo CT ($P < 0,01$). Em relação à avaliação dos níveis de TBARS, foi possível observar uma redução significativa deste marcador nos grupos tratados com Met, FBUB ou FBUT quando comparados ao grupo CT ($P > 0,01$). Quando avaliados os valores de EROs foi observada uma significativa redução destes somente no grupo FBUT quando comparado ao grupo DM2 ($P > 0,05$). É possível, também, observar um aumento significativo na concentração de nitritos em córtex cerebral de animais submetidos ao protocolo experimental de DM2 no grupo DM2 ($P < 0,01$).

Ademais, a Tabela 4 mostra os resultados referentes à avaliação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. Nesse sentido, foi possível observar que a administração de uma DHL em conjunto com dose única de STZ por via intraperitoneal comparada com o grupo CT foi capaz de diminuir significativamente a atividade da enzima antioxidante CAT em córtex cerebral ($P < 0,05$), enquanto que os tratamentos com Met, FBUB ou FBUT foram capazes em proteger frente a esta alteração ($P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente). Ao analisarmos a atividade da enzima antioxidante SOD em córtex cerebral, não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos experimentais ($P > 0,05$).

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados em hipocampo, foi possível observar que não houveram diferenças significativas quanto ao conteúdo tiólico total e TBARS em nenhum dos grupos experimentais ($P > 0,05$). Em relação aos níveis de EROs, foi possível observar que o protocolo de indução experimental foi capaz de aumentar significativamente este

parâmetro no grupo DM2 quando comparado ao CT ($P<0,05$). Curiosamente, a atividade da enzima antioxidante CAT se mostrou significativamente inferior no grupo DM2+Met quando comparado ao grupo DM2 ($P<0,01$). Ademais, a atividade SOD da enzima em hipocampo se mostrou significativamente reduzida nos grupos FBUB e FBUT ($P<0,01$ e $P<0,05$, respectivamente) quando comparados ao grupo CT.

Tabela 4: Efeito da administração de dieta hiperlipídica e STZ e tratamento com Met ou FBUB ou FBUT em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos a um protocolo de indução experimental de DM2

	CT	DM2	DM2+Met	FBUB	FBUT
<i>Córtex cerebral</i>					
Conteúdo tiólico total	60,65±4,81	55,52±2,76	70,20±2,49##	68,73±1,53##	68,03±1,92##
Níveis de TBARS	4,66±0,35	4,76±0,56	3,86±0,36**	4,06±0,24**	3,65±0,26**
Níveis de EROs	59,66±3,22	64,54±2,85	47,42±4,56	54,19±3,92	44,71±4,07#
Níveis de nitritos	14,83±1,19	24,92±3,49**	20,83±0,68	21,36±1,25	20,44±0,95
Atividade da CAT	2,13±0,18	1,39±0,10*	3,07±0,07##	2,60±0,31#	2,80±0,22##
Atividade da SOD	37,01±3,35	32,98±2,48	32,61±3,40	32,25±1,80	36,66±1,27
<i>Hipocampo</i>					
Conteúdo tiólico total	101,19±6,77	80,35±3,53	86,91±2,45	81,66±3,71	88,89±3,84
Níveis de TBARS	3,87±0,34	4,28±0,40	4,01±0,27	4,12±0,27	3,35±0,10
Níveis de EROs	39,35±6,06	64,24±3,98*	62,07±6,37	60,96±4,23	54,75±5,84
Atividade da CAT	1,98±0,20	2,70±0,24	1,68±0,08#	2,46±0,23	2,10±0,18
Atividade da SOD	35,50±2,02	41,58±2,72	34,57±1,90	29,80±1,99##	32,60±1,64#

Os dados estão representados como média \pm E.P. (n =5-7). ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. ## representa $P < 0,01$ e # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Conteúdo tiólico total expresso como nmol TNB/mg de proteína, níveis de TBARS expressos como nmol TBARS/mg de proteína, níveis de EROs expressos como umol DCF/mg de proteína, níveis de nitritos expressos como uM nitritos/mg de proteína, atividade da CAT e SOD expressas como U/mg de proteína. CAT, catalase, CT, controle; DM2, Diabetes Mellitus tipo 2; EROs, espécies reativas de oxigênio, FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina, SOD, superóxido dismutase, TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

5.7 Parâmetros de estresse oxidativo em fígado

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo em fígado, foi possível observar que a administração de DHL + STZ foi capaz de aumentar significativamente os níveis de conteúdo tiólico total em todos os grupos diabéticos ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo CT (Tabela 5). Ademais, o protocolo de indução experimental de DM2 aumentou significativamente os níveis de TBARS ($P < 0,05$), enquanto os tratamentos com FBUB ou FBUT foram capazes de proteger a estrutura hepática frente a este aumento ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente). Em relação aos níveis de EROs, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais ($P > 0,05$). Além disso, é possível observar que os níveis de nitritos estavam aumentados em todos os grupos diabéticos, de forma que os tratamentos não foram eficazes em proteger este aumento ($P < 0,001$).

Ademais, a Tabela 5 apresenta os resultados referentes à avaliação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD em estrutura hepática de ratos submetidos a um modelo experimental de DM2. Nesse sentido, foi possível observar que não houveram diferenças significativas na atividade da enzima CAT em nenhum dos grupos experimentais ($P > 0,05$). Por outro lado, foi possível observar uma redução significativa na atividade da enzima SOD nos grupos DM2, DM2+Met, FBUB e FBUT quando comparados ao controle ($P < 0,001$, $P < 0,001$, $P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente).

Tabela 5: Efeito da administração de dieta hiperlipídica e STZ e tratamento com Met ou FBUB ou FBUT em parâmetros de estresse oxidativo em fígado de animais submetidos a um protocolo de indução experimental de DM2

	CT	DM2	DM2+Met	FBUB	FBUT
Fígado					
Conteúdo tiólico total	111,8±3,08	137,6±2,28***	139,0±2,93***	139,2±3,28***	143,9±3,13***
Níveis de TBARS	8,10±0,66	12,13±0,69*	10,03±0,81	7,02±0,90###	7,16±0,73##
Níveis de EROs	35,03±2,07	22,52±1,31	27,02±3,46	24,86±1,52	28,60±1,52
Níveis de nitritos	21,88±2,88	41,50±1,14***	37,60±1,58***	43,26±1,11***	37,49±1,32***
Atividade da CAT	43,28±0,95	49,91±6,18	42,45±7,52	55,61±3,24	41,42±5,68
Atividade da SOD	45,38±1,72	27,85±2,36***	29,16±2,11***	22,07±3,22***	32,88±2,03**

Os dados estão representados como média ± E.P. (n =4-8). *** representa $P < 0,001$ ** representa $P < 0,01$ e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. ### representa $P < 0,001$ ## representa $P < 0,01$ e # representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo DM2. ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey. Conteúdo tiólico total expresso como nmol TNB/mg de proteína, níveis de TBARS expressos como nmol TBARS/mg de proteína, níveis de EROs expressos como umol DCF/mg de proteína, níveis de nitritos expressos como uM nitritos/mg de proteína, atividade da CAT e SOD expressas como U/mg de proteína. CAT, catalase, CT, controle; DM2, Diabetes Mellitus tipo 2; EROS, espécies reativas de oxigênio, FBUB, farinha do bagaço de uva branca, FBUT, farinha do bagaço de uva tinta, Met, metformina, SOD, superóxido dismutase, TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

5.8 Análises histológicas em pâncreas

A Figura 11 apresenta os resultados referentes à análise histológica do pâncreas. Nesse sentido, foi possível observar que o tecido pancreático dos animais do grupo CT apresentou organização típica em lóbus e lóbulos, células acinares íntegras e ilhotas facilmente visualizáveis e com a estrutura característica (Figura 11A-C). Por outro lado, os animais do grupo DM2 apresentaram alteração na estrutura típica das ilhotas de Langerhans e espaços entre as células, presença de vacúolos em algumas células acinares, bem como de alguns vasos congestionados (Figura 11D-F).

Todas essas alterações encontradas são compatíveis com os danos causados pelo modelo experimental de DM2 induzido por DHL + STZ. Em relação aos tecidos pancreáticos dos animais do grupo Met foi possível observar que estes são visualmente similares ao grupo CT em todas as características, apesar de algumas poucas alterações ainda serem encontradas (Figura 11G-I). A respeito da estrutura pancreática avaliada através de análises histológicas do grupo FBUB, foi possível observar que a mesma apresentou estrutura íntegra e características similares ao grupo CT, embora seja possível visualizar células acinares inchadas ou com vacúolos e vasos congestionados (Figura 11 J-L). Por fim, em relação às análises histológicas do pâncreas do grupo FBUT, foi possível observar a presença de alguns vasos congestionados e células acinares com vacúolos inchados, ilhotas pancreáticas com estrutura íntegra e em maior quantidade quando comparadas ao grupo CT, embora algumas apresentem espaços (Figura 11M-O).

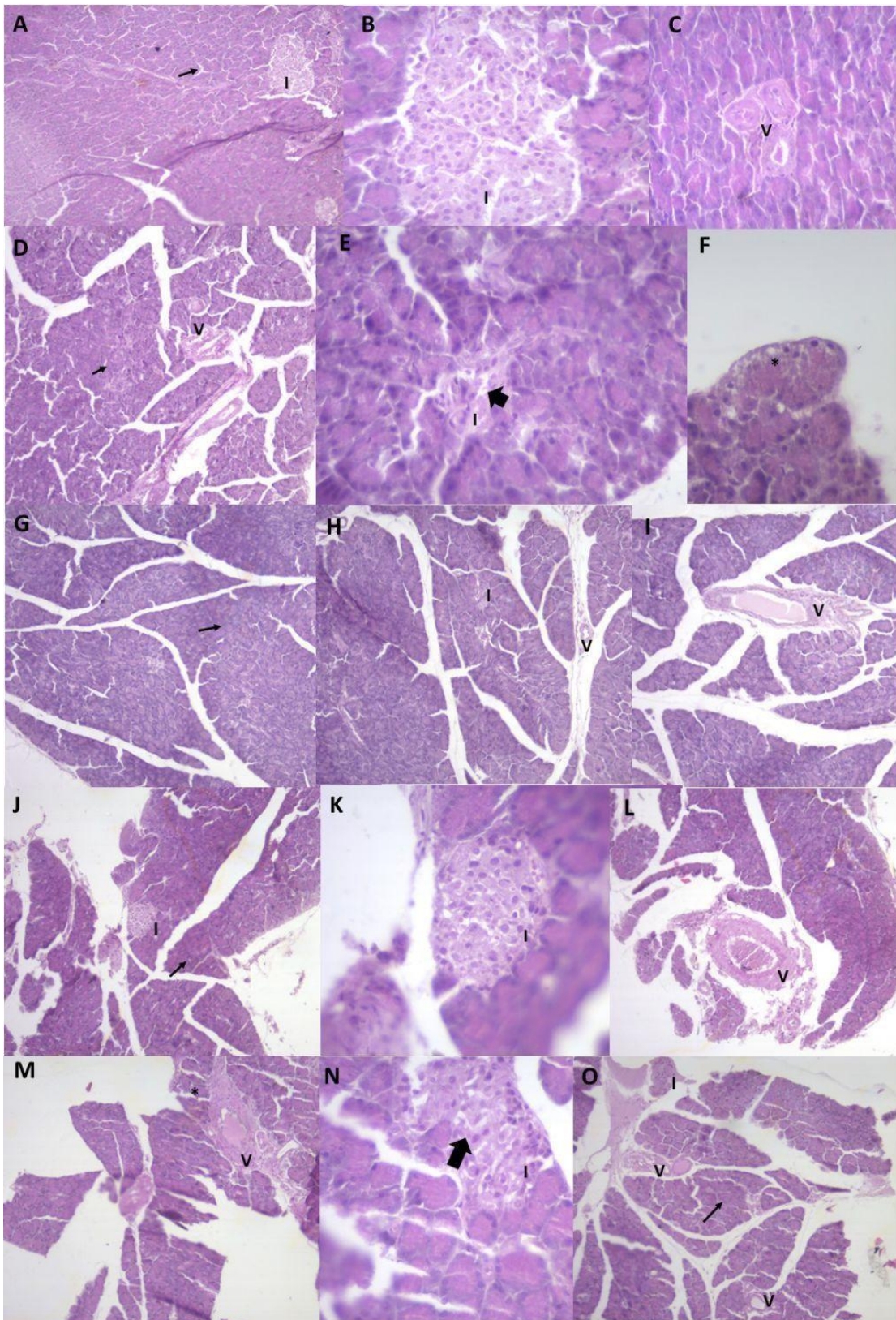


Figura 11: Características histológicas pancreáticas de ratos Wistar submetidos a um protocolo de indução experimental de Diabetes Mellitus tipo 2 tratados com Metformina ou farinha do bagaço de uva branca ou tinta. (A-C) CT, controle; (D-F) DM2, Diabetes *Mellitus* tipo 2; (G-H) DM2+Met, DM2 + Metformina, (J-L) FBUB, farinha do bagaço de uva branca, (M-O) FBUT, farinha do bagaço de uva tinta. Setas finas, ácinos com estrutura normal; I, Ilhotas de Langerhans; V, vasos; *vacúolos nas células acinares; setas largas, espaços nas ilhotas indicando alterações na estrutura; D, I, L e M, vasos congestionados.

6. Discussão

As uvas viníferas (*Vitis vinífera*), pertencentes à família Vitaceae, são compostas por elementos como antocianinas, flavonoides e outros compostos fenólicos. Esses compostos têm despertado grande interesse científico devido às suas propriedades antioxidantes (ALBA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019; CHEDEA *et al.*, 2022;), cardioprotetora (MUNOZ-BERNAL *et al.*, 2018; RIVERA *et al.*, 2019; TALADRID *et al.*, 2023) e potencial efeito hipoglicemiante (HERNÁNDEZ-SALINAS *et al.*, 2015). Apesar dessas qualidades, a indústria vinícola gera anualmente uma quantidade significativa de BU, que se caracteriza como um subproduto agroindustrial. O tratamento inadequado desse resíduo levanta preocupações de cunho socioeconômico e ambientais. Contudo, é possível valorizá-lo a partir da confecção de FBU e destiná-lo para outros fins (FERREIRA & SANTOS, 2022). Em um contexto global de saúde pública, o DM2 emerge como uma preocupação séria, cujas projeções vêm sendo superadas a cada nova triagem, acarretando considerável impacto financeiro anual (DSDB, 2022).

No presente estudo, avaliamos os efeitos do tratamento com FBU provenientes das castas viníferas, 'Arinto' (FBUB) e 'Touriga Nacional' (FBUT), em parâmetros metabólicos, bioquímicos séricos, comportamentais, oxidativos e histológicos utilizando um modelo experimental de DM2. A indução experimental de DM2 foi realizada por meio da administração de DHL combinada com baixa concentração de STZ (35mg/kg) em dose única, via intraperitoneal (i.p.), seguindo um modelo amplamente utilizado na literatura (SRINIVASAN *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2023). A STZ é conhecida por causar RI e disfunção das células β -pancreáticas, semelhante aos aspectos fisiopatológicos observados na condição de DM2 (DUAN *et al.*, 2022). Acredita-se que a STZ seja absorvida pela célula por meio do transportador de glicose GLUT2, o que leva à alquilação de proteínas e eventual apoptose das células β . Cabe ressaltar que, uma vez que a STZ entra na célula via GLUT2, sua ação tóxica não se restringe apenas às células pancreáticas, podendo também afetar outros tecidos, como o fígado (DEEDS *et al.*, 2011). No escopo deste estudo foram investigados os efeitos da DHL juntamente com a administração de STZ sobre o consumo de ração e água,

ganho de peso, peso relativo do tecido adiposo e pâncreas, parâmetros comportamentais, níveis séricos de glicose, perfil lipídico, níveis séricos de ureia, ácido úrico, creatinina, proteína, atividade das transaminases AST e ALT e índice TyG, além de atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, marcadores de estresse oxidativo, incluindo o conteúdo tiólico total, níveis de TBARS e nitritos em tecidos cerebrais e hepáticos, e análise de características histológicas pancreáticas. Adicionalmente, analisamos o potencial protetor da administração de Met ou FBUB ou FBUT em relação às alterações induzidas pela combinação de DHL e STZ.

Embora não sejam observados na totalidade de indivíduos portadores de DM2, os sinais clássicos da DM, conhecidos como os “4 Ps” são: poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso (DSBD, 2022). Nesse sentido, após a indução experimental de DM2 a partir da injeção intraperitoneal de STZ em baixa dose (35 mg/kg), foi possível observar perda considerável de peso e aumento da ingestão hídrica, além de, curiosamente, diminuição na ingestão alimentar, de forma que os tratamentos com FBUB ou FBUT não foram capazes de prevenir esses efeitos. Tais resultados corroboram com achados prévios de Correia-Santos e colaboradores (2012) que demonstraram em modelo experimental de DM2 a redução da ingestão alimentar em ratas Wistar alimentadas com DHL ou dieta controle após a injeção i.p. de STZ, além de poliúria e perda de peso considerável, decorrentes da hiperglicemia induzida pelo modelo experimental.

Entre as características patológicas centrais do DM2 estão a desregulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Esses fatores desencadeiam graves consequências, incluindo disfunções de longo prazo na fisiologia de órgãos vitais, em especial, devido ao quadro de hiperglicemia crônica observada em pacientes não tratados que é especialmente nociva ao funcionamento fisiológico do organismo (ALFHEEAID *et al.*, 2023). Nesse sentido, dentre os principais efeitos exercidos pela Met no controle glicêmico estão a inibição da gliconeogênese e ativação da captação e utilização periférica de glicose pelos órgãos periféricos (MENG *et al.*, 2017). Além disso, evidências sugerem que as ações hipoglicêmicas dos polifenóis e flavonoides, como os encontrados nas FBUB e FBUT, derivam da sua habilidade em intervir em diversas vias metabólicas. Isso inclui a inibição da

captação de glicose pelo transportador de glicose sódio-dependente (SGLT1), a inibição de enzimas que catalisam a hidrólise de carboidratos como a α -amilase e a α -glicosidase, a diminuição da absorção de glicose a nível intestinale o estímulo da secreção insulínica, possibilitando assim o aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos através do transportador de glicose GLUT4 e a proteção das células β -pancreáticas contra a glicotoxicidade (AMIOT *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2018). Entretanto, os efeitos hipoglicêmicos observados na dosagem sérica de glicose dos animais tratados com FBUB e FBUT não se refletem igualmente nos resultados obtidos a partir da sobrecarga oral de glicose no TOTG, já que esses tratamentos não foram capazes de atenuar o pico glicêmico observado no período pós-prandial.

Nesse sentido, de acordo com a literatura, a manifestação da ação hipoglicêmica pós-prandial de subprodutos da indústria vinícola é dependente da dose administrada e da dieta concomitante (URQUIAGA *et al.*, 2018). Sendo assim, pode-se supor que os resultados observados estejam associados à concentração insuficiente de FBU nas dietas oferecidas aos animais ou ainda, complementarmente, com o consumo contínuo de DHL, consideravelmente concentrada em gorduras e carboidratos, o que acentua de maneira mais exacerbada as disfunções no metabolismo glicêmico, reduzindo consideravelmente a capacidade da FBUB e FBUT de atenuar os insultos glicêmicos observados.

Em relação ao perfil lipídico, os resultados obtidos no presente estudo indicam que os tratamentos com Met, FBUB ou FBUT foram capazes de exercer um efeito modulador positivo a partir da prevenção do aumento das concentrações séricas de TG e CT induzidas pelo protocolo experimental. Ademais, os níveis de HDL foram significativamente superiores nos animais que receberam a DHL suplementada com FBUT. Essas descobertas corroboram com estudos prévios de Lanzi e colaboradores (2016), que relataram que a administração de BU foi eficaz em reduzir as concentrações de TG em um modelo animal de SM induzida por dieta rica em lipídios e frutose. De acordo com a literatura, o potencial efeito anti-hiperlipidêmico da FBU pode ser atribuído à ação da fibra solúvel presente em sua composição, uma vez que esta é capaz de inibir a emulsificação lipídica e, conseqüentemente, hidrólise dos triglicerídeos (TALADRID *et al.*, 2023).

Além disso, a ação conjunta das fibras com os compostos fenólicos antioxidantes presentes nas FBU pode promover a modulação da absorção de colesterol. Esse efeito pode ser atribuído à capacidade das FBU de desestabilizar as micelas de colesterol, diminuindo, assim, sua solubilidade e disponibilidade. Esse processo favorece a reabsorção e excreção do colesterol, através da ligação com sais biliares (RAHBAR, MAHMOUDABADIA & ISLAM, 2015, RIVERA *et al.*, 2019).

O índice TyG é um parâmetro que reflete a RI e vem sendo amplamente utilizado em estudos clínicos devido à sua simplicidade e baixo custo de execução. Notavelmente, esse índice demonstra concordância com o método clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, padrão-ouro para diagnóstico desta condição (TAO, *et al.*, 2022; ZHAO, *et al.*, 2022). Além disso, em virtude dos níveis elevados de TG representarem um importante fator de risco para DCV e SM, a avaliação do índice TyG se apresenta como uma abordagem que não apenas reflete o estado glicêmico, mas também o *status* de saúde cardiovascular do paciente (SELVI *et al.*, 2021). Os dados demonstrados em nosso estudo são condizentes com o indicativo de risco cardiovascular aumentado nos grupos diabéticos, enquanto os tratamentos com Met, FBUB ou FBUT demonstraram potenciais efeitos protetores. Esses resultados corroboram com os achados por De Moraes e colaboradores (2021), que mostraram um aumento no índice TyG associado a elevação da concentração de TG e glicose em ratos alimentados com uma solução concentrada de sacarose e tratados com pterostilbeno, um análogo do resveratrol. Além disso, Alarcon e colaboradores (2017) observaram a elevação do índice TyG e proteína C reativa em coelhos metabolicamente obesos, mas com peso normal, alimentados com DHL. Os autores ressaltam a influência do consumo de uma dieta inadequada, em especial com elevadas concentrações de lipídios e/ou carboidratos, no aumento do risco cardiovascular, mesmo em indivíduos com peso saudável.

Diversas evidências têm estabelecido uma relação entre a hiperglicemia crônica e o desenvolvimento de distúrbios neurocomportamentais (SEMENKOVICH *et al.*, 2015; ZEMDEGS *et al.*, 2019; STOLEN *et al.*, 2020; KOTAGALE *et al.*, 2021; NEVO-SHENKER & SHALITIN, 2021; ZGLEJC-WASZAK *et al.*, 2023). Neste contexto, os resultados obtidos a partir dos testes

comportamentais demonstraram que a indução experimental de DM2 por meio da administração de DHL em conjunto com injeção intraperitoneal de STZ apresentou uma tendência ao desenvolvimento de comportamento tipo-ansioso, como pode ser identificado no TLCE, sendo este comportamento prevenido pelo consumo de FBUB e FBUT. Cabe ressaltar que o TLCE é uma das metodologias experimentais mais amplamente empregadas para a avaliação de comportamento tipo-ansioso em roedores. Esse teste está baseado na aversão natural a espaços abertos, que é visto como o animal passando mais tempo nos braços fechados do labirinto (KRAEUTER, GUEST & SARNYAI, 2019).

Esse achado é particularmente interessante, uma vez que a ansiedade se manifesta como uma característica predominante em distúrbios depressivos, podendo anteceder o início dessas doenças (KALE *et al.*, 2020). Resultados similares foram observados no estudo conduzido por Solanki e colaboradores (2017) em um modelo de derrota social, onde o tratamento com a farinha de uva demonstrou potencial de prevenção e reversão dos déficits comportamentais no TLCE. Os autores atribuíram esses resultados aos efeitos preventivos do resveratrol e da quercetina contra a redução da capacidade antioxidante celular induzida pelo estresse oxidativo.

O estresse oxidativo representa um dos principais mecanismos contribuintes para o desenvolvimento da RI e suas complicações associadas ao DM2, uma vez que provoca alterações fisiopatológicas em nível molecular e perturbações em vias metabólicas (YARIBEYGI *et al.*, 2020). Com base na literatura, o estresse oxidativo é significativamente aumentado em modelos de DM2 induzidos por STZ. Isso ocorre como consequência da destruição das células β -pancreáticas após a administração de STZ, que é citotóxico. Logo, a diminuição das células β reduz a capacidade antioxidante no órgão, permitindo o acúmulo de EROs no tecido pancreático, que por sua vez, contribui para a progressão da DM2 (HALIM & HALIM, 2019; DUAN *et al.*, 2022; CARDOSO *et al.*, 2023). Nesse contexto, a análise do impacto do consumo de FBUB e FBUT no perfil oxidativo das estruturas cerebrais revelou efeitos potencialmente protetores frente ao estresse oxidativo. Os tratamentos com Met, FBUB ou FBUT aumentaram o conteúdo tiólico total e diminuíram os níveis de TBARS, enquanto o tratamento com FBUT reduziu os níveis de EROs e preveniu o

aumento no conteúdo de nitritos no córtex cerebral causados pelo protocolo de indução experimental ao DM2.

Ademais, embora mais discretos, mas relevantes, foram observados efeitos de proteção oxidativa dos tratamentos quanto à prevenção do aumento dos níveis de EROs causados pela administração combinada de DHL com STZ em hipocampo. Concomitantemente, os tratamentos foram eficazes na prevenção da redução na atividade da CAT em córtex cerebral induzida pelo protocolo experimental. No entanto, curiosamente, a atividade da CAT mostrou-se reduzida no hipocampo dos animais tratados com Met quando comparados ao grupo DM2. Além disso, não foram observadas diferenças significativas quanto à atividade cerebral da enzima SOD em córtex, mantendo-se em estado de homeostase. Por outro lado, a enzima demonstrou atividade reduzida em hipocampo nos grupos que receberam FBUB e FBUT.

Embora não sejam classificados como nutrientes, os compostos bioativos apresentam uma ampla gama de potenciais benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças. Nesse contexto, embora os organismos detenham defesas antioxidantes endógenas que mantêm a homeostase, os compostos antioxidantes exógenos desempenham um papel importante ao retardar ou impedir a oxidação de substratos oxidáveis. (SCHWARTZ *et al.*, 2020). Com base nas características do *status* redox observadas no presente estudo, sugere-se que a administração de DHL + STZ resultou em aumento da peroxidação lipídica cerebral em animais não tratados, enquanto esse efeito não foi observado nos animais tratados com Met, FBUB ou FBUT.

De acordo com Copetti e colaboradores (2018), os compostos bioativos presentes nos subprodutos da uva podem aumentar a capacidade oxidante das células, estimulando a expressão enzimática, além de reduzir as EROs através da inibição de sua síntese ou via estímulo da desintoxicação xenobiótica. Por outro lado, evidências da literatura sugerem que a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como as observadas em hipocampo, pode ser consequência do efeito poupador dos antioxidantes dietéticos. Ou seja, na presença de elevadas concentrações de antioxidantes provenientes de fontes exógenas circulantes, a necessidade da função antioxidante enzimática é reduzida (DÉCORDÉ *et al.*, 2008).

Corroborando, Goutzourelas e colaboradores (2015) conduziram uma investigação sobre os efeitos antioxidantes *in vitro* do extrato de BU tinta em concentrações não citotóxicas. Nesse sentido, embora a atividade da enzima CAT tenha apresentado diminuição em células endoteliais, a atividade da SOD não apresentou diferenças significativas em músculo ou endotélio. Por outro lado, ao analisar a atividade das enzimas antioxidantes GST e GSH, os autores identificaram um aumento significativo em ambas as linhagens celulares. Dentro desse contexto, os autores propuseram que a indução dos sistemas de glutathione (GSH) desempenha um papel crucial nos efeitos antioxidantes mediados pelo extrato de BU. Corroborando com esses resultados, os efeitos do extrato de semente de uva nas atividades da CAT e SOD em células eucarióticas foram influenciados pela presença ou ausência de estímulo de estresse oxidativo, o qual é mediado pela via de sinalização da quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), conforme investigado em um estudo desenvolvido por Yang e colaboradores (2014).

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem uma visão abrangente dos efeitos do protocolo de indução experimental de DM2 e dos tratamentos com Met, FBUB e FBUT sobre os parâmetros de estresse oxidativo, marcadores de dano hepático, atividade de enzimas antioxidantes e transaminases no fígado de ratos. No contexto hepático de indivíduos com DM2, o comprometimento do controle glicêmico tem sido associado com a diminuição da expressão de GLUT4 e aumento de GLUT2, promovendo o efluxo de glicose no fígado, onde a elevada síntese de glicose é garantida pelo incremento da atividade gliconeogênica (YONAMINE *et al.*, 2017). Como resultado, tem-se níveis excessivos de glicose circulante e aumento dos ácidos graxos livres (AGL), desencadeando danos celulares devido ao estresse oxidativo e agravando as complicações do DM2. No entanto, diversos polifenóis antioxidantes têm sido identificados como protetores dos impactos adversos da hiperglicemia no DM2 (KANG *et al.*, 2020).

Em relação ao estresse oxidativo no tecido hepático, a administração de DHL combinada com a injeção de STZ resultou em um aumento significativo nos níveis de conteúdo tiólico total em todos os grupos diabéticos em comparação ao CT. Resultados semelhantes foram observados em um modelo experimental de hipermetioninemia aguda conduzido por Meine e

colaboradores (2020), onde o tratamento com ácido tânico não foi capaz de reverter o aumento do conteúdo tiólico total causado pelo tratamento combinado induzido. Esse aumento pode ser interpretado como uma resposta adaptativa das células hepáticas à maior demanda antioxidante induzida pelo estresse oxidativo associado à DM2. Essa tendência também pode ser observada na pesquisa realizada por Buchner e colaboradores (2014), onde a administração crônica de uva convencional (*Vitis labrusca*) e orgânica - rica em conteúdos polifenólicos e vitaminas - demonstraram efeitos hepatoprotetores frente às disfunções causadas pela administração de uma DHL em ratos da linhagem Wistar.

Além disso, os resultados sugerem que o protocolo de indução experimental de DM2 aumentou a peroxidação lipídica no fígado dos ratos diabéticos, a qual foi mitigada pelos tratamentos com FBUB ou FBUT. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Schmatz e colaboradores (2012), onde o tratamento com resveratrol em animais induzidos ao DM2 com administração de STZ foi capaz de impedir o aumento da peroxidação lipídica. Em contraste, os níveis de nitritos, que podem estar associados à regulação do óxido nítrico (NO), permaneceram elevados em todos os grupos diabéticos, indicando uma possível disfunção no equilíbrio redox relacionado ao NO, o qual, não foi modulado pelos tratamentos. Resultados semelhantes foram descritos no estudo apresentado por Belviranlı e colaboradores (2012), evidenciando que os níveis hepáticos de nitritos foram aumentados tanto nos grupos submetidos a indução experimental de DM quanto nos grupos diabéticos que receberam o extrato da semente da uva quando comparados aos grupos controle.

No que concerne à atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático, Quatrin e colaboradores (2018) investigaram o potencial efeito hepatoprotetor do extrato da casca de jabuticaba em um modelo experimental de DM2 induzido em ratos. Os resultados apresentados pelos autores mostraram que o grupo de animais diabéticos não submetidos ao tratamento apresentaram atenuação da atividade enzimática SOD. Além disso, também foi relatado que nos grupos de animais tratados, nenhuma das doses testadas foi capaz de restaurar os efeitos causados pela DM2. Esses estudos corroboram com os resultados encontrados neste estudo, onde é possível sugerir que a

redução na atividade da SOD nos grupos diabéticos pode ser atribuída ao estresse oxidativo crônico e a consequente sobrecarga do sistema antioxidante endógeno (BHATTI *et al.*, 2022). Além disso, Samadi-Noshahr e colaboradores (2020) observaram que o tratamento com extrato de erva doce ou do seu componente ativo, trans-anetol, em modelo experimental de lesão hepática induzida por STZ demonstrou atividade reduzida da SOD quando comparados ao grupo controle. Embora os tratamentos com FBUB e FBUT não tenham restabelecido completamente a atividade da SOD, eles atenuaram essa diminuição, sugerindo um efeito protetor moderado sobre essa enzima antioxidante essencial.

A disfunção das células β -pancreáticas, induzida por fator de lesão, é um dos principais contribuintes para a patogênese do diabetes. Nesse contexto, a STZ, um composto glicosamina-nitrosureia, é significativamente tóxico às células β -pancreáticas de mamíferos (DUAN *et al.*, 2022). Sendo assim, quando combinada aos efeitos metabólicos do consumo de uma DHL, a administração de STZ em baixa e única dose (35 mg/kg) reproduz um modelo experimental de DM2 amplamente utilizado na literatura, uma vez que ocasiona disfunções no funcionamento das células pancreáticas, resultando em alterações estruturais de células, favorecimento da presença de vacúolos e do congestionamento de vasos (DEEDS *et al.*, 2011; DUAN *et al.*, 2022), que são consistentes com os resultados observados no presente estudo. Por outro lado, o tratamento com Met, FBUB ou FBUT demonstrou ser eficaz na proteção do tecido pancreático frente a essas alterações.

7. Conclusão

Neste modelo experimental, a administração de FBUB e FBUT demonstrou efeitos protetores frente às alterações glicêmicas, lipídicas, oxidativas e histológicas decorrentes de DM2 induzido pela combinação de DHL e STZ. Esses achados contribuem para uma compreensão mais aprofundada dos impactos dos subprodutos da uva na atenuação dos sinais do DM2. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais a fim de complementar o conhecimento e fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas promissoras. Adicionalmente, investigações

complementares são recomendadas para elucidar as vias essenciais relacionadas aos efeitos terapêuticos e preventivos da administração de FBUB e FBUT frente às disfunções decorrentes do DM2.

8. Referências Bibliográficas

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-6, 1984.

AHMAD, E. *et al.* Type 2 diabetes. **Lancet**. V.400, n. 10365, p.1803-1820, 2022.

ALFHEEAID, H.A. *et al.* Effect of Various Intermittent Fasting Protocols on Hyperglycemia-Induced Cognitive Dysfunction in Rats. **Brain Sciences**. v.13, n.2, p.1-10, 2023.

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-5, 2001.

ALARCON, G. *et al.* High fat diet-induced metabolically obese and normal weight rabbit model shows early vascular dysfunction: mechanisms involved. **International Journal of Obesity**. v. 42, n.9, p. 1535-1543, 2018.

ALBA, D.F. *et al.* Use of grape residue flour in lactating dairy sheep in heat stress: Effects on health, milk production and quality. **Journal of Thermal Biology** v. 82, p.197–205, 2019.

ALI S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p.637-48, 1992.

AMBRIZ-PÉREZ, D. L. *et al.* Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1131412, 2016

AMIOT M.J; RIVA C.; VINET A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review, **obesity reviews**. V.17, n.7, p.573-586, 2016.

ANTONIC, B. *et al.* Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Foods**. V. 9, p.1-20, 2020.

AOAC - **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18. ed. Washington DC US, 2006.

ARNETH, B. ARNETH, R. SHAMS, M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**. V.20, n. 10, p.1-14, 2019.

AUBERVAL, N. *et al.* Beneficial effects of a red wine polyphenol extract on high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **European Journal of Nutrition**. v.56, n. 4, p.1467-p.1475, 2017.

AVERILLA, J. N. *et al.* Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. **Food Science and Biotechnology**. v.28, n.6, p.1607-1615, 2019.

BARREIROS, A.L.B.S. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. V. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

BELVIRANLI, M. *et al.* Oxidative stress and anti-oxidant status in diabetic rat liver: Effect of plant polyphenols. **Archives of Physiology and Biochemistry**. v. 118(5), p. 237-243, 2012.

BHATTI, J. S. *et al.* Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 184, p. 114-134, 2022

BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-54, 1976.

BUCHNER, I. *et al.* Hepatoprotective and Antioxidant Potential of Organic and Conventional Grape Juices in Rats Fed a High-Fat- Diet. **Antioxidants (Basel)**. v. 3(2), p. 323-338, 2014.

CABRITA, M.J. *et al.* Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 86, p.922-931, 2006.

CARDOSO, J.S. *et al.* *Psidium cattleianum* fruit extract prevents systemic alterations in an animal model of type 2 diabetes mellitus: comparison with metformin effects. **Biomarkers**. v.28, n.2, p.238-248, 2023.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. V.46, n.4, p.419-425, 2002.

CHANG, E., KIM, C.Y. Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. **Molecules**. v.24, n.6, p.1157, 2019.

CHARRADI, K. *et al.* Dietary supplementation of grape seed and skin flour mitigates brain oxidative damage induced by a high-fat diet in rat: Gender dependency. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 87, p. 519-526, 2017.

CHEDEA, V.S. *et al.* Grape Pomace Polyphenols as a Source of Compounds for Management of Oxidative Stress and Inflammation—A Possible Alternative for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs? **Molecules**. V. 27, p.1-23, 2022.

CONAB, “COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO”. **Visão analítica da viticultura sul-rio-grandense, 2019**. Acessado em 20 fev 2023. Online. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>.

COPETTI, C. *et al.* Acute Consumption of Bordo Grape Juice and Wine Improves Serum Antioxidant Status in Healthy Individuals and Inhibits Reactive Oxygen Species Production in Human Neuron-Like Cells. **Journal of Nutrition and Metabolism**. V. 2018:4384012, p.1-11, 2018.

CORREIA, A.C.; JORDÃO, A.M. Antioxidant capacity, radical scavenger activity, lipid oxidation protection analysis and antimicrobial activity of red grape extracts from different varieties cultivated in Portugal. **Natural Product Research**. V. 29, n.5, p.438-440, 2015.

CORREIA-SANTOS, A.M. *et al.* Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose estreptozotocina em em ratas wistar. **Revista de Medicina (USP Ribeirão Preto)**. v.45, n.4, p.436-444, 2012.

DA COSTA, G.F. *et al.* The Beneficial Effect of Anthocyanidin-Rich *Vitis vinifera* L. Grape Skin Extract on Metabolic Changes Induced by High-Fat Diet in Mice Involves Antiinflammatory and Antioxidant Actions. **Phytotherapy Research**. v.31, p.1621-1632, 2017.

DAMANIK, J.; YUNIR, E. Type 2 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairment. **The Indonesian Journal of Internal Medicine**. V.53, n.2, 2021.

DÉCORDÉ, K. *et al.* Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.52, p.400-407, 2008.

DEEDS, M.C. *et al.* Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory animals**. v.45, n.3, p.131-140, 2011.

DE MORAIS, J.M.B. *et al.* Pterostilbene influences glycemia and lipidemia and enhances antioxidant status in the liver of rats that consumed sucrose solution. **Life Sciences**. v. 269, p.1-10, 2021.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019-2020. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf> Acessado em: 10 de Fevereiro de 2023.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2022. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/>. Acessado em 10 de fevereiro de 2023.

DUAN, J. *et al.* Curcumin protects islet beta cells from streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus injury via its antioxidative effects. **Endokrynologia Polska**. v.73, n.6, p.942-946, 2022.

ESEBERRI, Y. *et al.* Variability in the Beneficial Effects of Phenolic Compounds: A Review. **Nutrients**. v.14, n.9, p.1925, 2022.

FERREIRA, S.M.; SANTOS, L. A Potential Valorization Strategy of Wine Industry by-Products and Their Application in Cosmetics—Case Study: Grape Pomace and Grapeseed. **Molecules**. v.27, n.3, 2022.

FORMAN, H.J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Public Health Emergency Collection**. V.20, n. 9, p.689-709, 2021.

FRUM, A. *et al.* Valorization of Grape Pomace and Berries as a New and Sustainable Dietary Supplement: Development, Characterization, and Antioxidant Activity Testing. **Nutrients**. V.14, n.15, p.1-14, 2022.

GAZAL M. *et al.* Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamineinduced model of mania in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, p. 132–9, 2014

GOMEZ-BRANDON, M. *et al.* Strategies for recycling and valorization of grape marc. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.39, n.4, p.437–450, 2019.

GOUTZOURELAS, N. *et al.* Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 36, n.2, p.433-441, 2015.

HALIM, M.; HALIM, A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**. V.13, p.1165-1172, 2019.

HERNÁNDEZ-SALINAS, R. *et al.*, Antioxidant and anti-hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a high fructose diet. **Biological Research**. v.1, n.53, p.48-53, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. DIABETES ATLAS 10th edition 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF Atlas 10th Edition 2021.pdf> Acessado em: 10 de Fevereiro de 2023.

JACQUES, A.C. *et al.* Elaboração de farinha de uva utilizando bagaço da indústria vitivinícola: efeito sob os compostos fenólicos. p. 4283-4287. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2014.

JIAO, Y. *et al.* Antidiabetic effects of *Morus alba* fruit polysaccharides on high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. V.119, p.119-127, 2017.

KALE, M. *et al.* Agmatine modulates anxiety and depression-like behaviour in diabetic insulin-resistant rats. **Brain Research**. v. 1747, p.1-10, 2020.

KANDIMALLA, R. *et al.* Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. **Biochimica et biophysica acta. Molecular Basis of Disease**. V.1863, n.5, p.1078-1089, 2017.

KANG, G.G. *et al.* Dietary Polyphenols and Gene Expression in Molecular Pathways Associated with Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**. v.21, n.1, p.1-26, 2020.

KIM, Y.; KEOGH, J.B.; CLIFTON, P.M. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**. v.8, n.17, p.1-27, 2016.

KHUTAMI, C. *et al.* The Effects of Antioxidants from Natural Products on Obesity, Dyslipidemia, Diabetes and Their Molecular Signaling Mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**. V.23, n.4, p.1-23, 2022.

KOTAGALE, N. *et al.* Possible involvement of agmatine in neuropharmacological actions of metformin in diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**. v.907, p.1-13, 2021.

KRAEUTER, A.; GUEST, P.C.; SARNYAI. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Methods in molecular biology**. V.1916, p.69-74, 2019.

LANZI, C.R. *et al.* Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. **Food & function**. v.7, n.3, p.1544-1553, 2016.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**. V. 13, p. 757–772, 2018.

LINGUA, M.S. *et al.* *In vivo* antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. **Journal of Functional Foods**. V.20, p.332- 345, 2016.

MARTIN, M.A.; RAMOS, S. Dietary Flavonoids and Insulin Signaling in Diabetes and Obesity. **Cells**. V. 10, n.6, p.1-22, 2021.

MATKOVICS, B. *et al.* The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. **Hormone and Metabolic Research**, v.14, p.77-79,1982.

MEINE, B.D.M. *et al.* Ameliorative effect of tannic acid on hypermethioninemia-induced oxidative and nitrosative damage in rats: biochemical-based evidences in liver, kidney, brain, and serum. **Amino Acids**. v. 52 (1-12), p. 1545-1558, 2020.

MENG, X.M. *et al.* Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v.21, p.2232-2237, 2017.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-5, 1972.

MOREIRA, M.M. Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. **Science of the Total Environment**. V.634, p.831-842, 2018.

MUNOZ-BERNAL, O.A. *et al.* Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. **Food Research International**. V. 140, p.1-17, 2021.

MUNOZ-BERNAL, O.A. *et al.* Orujo de uva como ingrediente de alimentos funcionales. 1º edição, p.457–492, 2018.

MURIACH, M. *et al.* Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. V.2014, p.1-9, 2014.

NERVO-SHENKER, M.; SHALITIN, S. The Impact of Hypo- and Hyperglycemia on Cognition and Brain Development in Young Children with Type 1 Diabetes. **Hormone research in pediatrics**. v.94, p.115-123, 2021.

OIV, "International Organization of Vine and Wine," **Report,2019**, Acessado em 12 fev. 2023. Online. Disponível em: <http://www.oiv.int/>.

OIV, "International Organization of Vine and Wine," **World Wine Production Outlook OIV First Estimates**, Acessado em 21 fev. 2023. Online. Disponível em:
https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/EN_OIV_2022_World_Wine_Production_Outlook.pdf

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annual Review Medicine**, v. 95, p. 351-8, 1979.

OLIVEIRA, R.M. *et al.* Composição centesimal de farinha de uva elaborada com bagaço da indústria vitivinícola. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. V.2, n.1, p.1-6, 2016.

OLIVEIRA, J.S. *et al.* Histomorphometric and oxidative evaluation of the offspring's testis from type 2 diabetic female rats treated with metformina and pentoxifylline. **International Journal of Experimental Pathology**. V.103, p.174-189, 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Classification of diabetes mellitus. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/classification-of-diabetes-mellitus> Acessado em: 10 de Fevereiro de 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global report on diabetes, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/diabetes/global-report/en/> Acessado em: 10 de Fevereiro de 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. DIET, NUTRITION AND THE PREVENTION OF CHRONIC DISEASES. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation Disponível em:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf?sequence=1 Acessado em 21 de Fevereiro de 2023.

PALMA, M.L. *et al.* Preliminary sensory evaluation of salty crackers with grape pomace flour. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**. V.17, n.1, p. 33-43, 2020.

PALMA, M.L. *et al.* Preliminary sensory evaluation of grape pomace flour sweet cookies. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**. V.18, n.1, p.92-102, 2021.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I., Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2, n.5, p.270-p.278, 2009.

PEIXOTO, C.M. *et al.* Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. **Food Chemistry**, v.253, p.132-138, 2018.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p.149-p.167, 1985.

PETRY, E.R. *et al.* Exercício físico e estresse oxidativo: mecanismos e efeitos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. n.18, v.4, p.90-99, 2010.

PINHO, P.G. *et al.* Further Insights into the Floral Character of Touriga Nacional Wines. **Journal of Food Science**. V. 72, n. 6, p.396-401, 2007.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V.97, p.55-74, 2015.

QUATRIN, A. *et al.* The Hepatoprotective Effect of Jabuticaba Peel Powder in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Involves the Modulation of Thiol/Disulfide Redox State through the Upregulation of Glutathione Synthesis. **Journal of Nutrition and Metabolism**. v. 2018, p. 1-13, 2018.

RACHDAOUI, N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**. V.21, n.5, p. 1-21, 2020.

RAHBAR, A.R.; MAHMOUDABADI, M.M.S.; ISLAM, M.S. Comparative effects of red and white grapes on oxidative markers and lipidemic parameters in adult hypercholesterolemic humans. **Food & Function**. v.6, n.6, p.1992-1998, 2015.

REHMAN, K.; AKASH, M.S.H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? **Journal of Cellular Biochemistry**. V.118, n.11, p.3577-3585, 2017.

RIVERA, K. *et al.* Red Wine Grape Pomace Attenuates Atherosclerosis and Myocardial Damage and Increases Survival in Association with Improved Plasma Antioxidant Activity in a Murine Model of Lethal Ischemic Heart Disease. **Nutrients**. V.11, n.9, p.1-17, 2019.

SALLES, B.C.C. *et al.* Sinalização mediada pela insulina em vias anabólicas. **Revista Farmácia Generalista**. v. 1, n. 2, p. 25-45, 2019.

SAMADI-NOSHAHR, Z. *et al.* The hepatoprotective effects of fennel seeds extract and *trans*-Anethole in streptozotocin-induced liver injury in rats. **Food Science & Nutrition**. v. 9(2), p. 1121-1131, 2020.

SCHWARTZ, C.G.K. *et al.* Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: An *in vitro*, *in silico* and *in vivo* study of α -amylase and α -glucosidase inhibition. **Food Research International**. v. 137, 109462, 2020.

SELVI, N. *et al.* Association of Triglyceride–Glucose Index (TyG index) with HbA1c and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. **Maedica a Journal of Clinical Medicine**. v.16, n.3, p.375-381, 2021.

SCHMATZ, R. *et al.* Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**. v. 94(2), p. 374-383, 2012.

SEMENKOVICH, K. *et al.* Depression in type 2 diabetes mellitus: prevalence, impact, and treatment. **Drugs**. v.75, n.6, p.577-587, 2015.

SHI, J. *et al.* Zi Shen Wan Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: An *in vitro*, *in silico* and *in vivo* study of α -amylase and α -glucosidase inhibition Fang Attenuates Neuroinflammation and Cognitive Function Via Remodeling the Gut Microbiota in Diabetes-Induced Cognitive Impairment Mice. **Frontiers in Pharmacology**. v.13, p. 898360, 2022.

SINGH, A. *et al.* Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. **Molecules**. V.27, n.3, p.1-20, 2022.

SINGH, S., *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* NCDC17 ameliorates type-2 diabetes by improving gut function, oxidative stress and inflammation in high-fat-diet fed and streptozotocin treated rats. **Beneficial Microbes**, v.8, p.243-255, 2017.

SISDEVIN, “Sistema de Declarações Vinícolas” da Secretaria da Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação. **Produção de uvas e produtos vitivinícolas elaborados na safra 2022, no Estado do Rio Grande do Sul - resumo geral**. Acessado em 20 fev. 2023. Online. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202210/26113534-sisdevin-2022-safra-da-uva-e-producao-vitivinicola-resumo-1.pdf>

SLOTEN, T.T.V. *et al.* Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression. **The Lancet. Diabetes & Endocrinology**. v. 8, n.4, p.325-336, 2020.

SNEZHKINA, A.V. *et al.* ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-17, 2019.

SOLANSKI, N. *et al.* Modulating Oxidative Stress Relieves Stress-Induced Behavioral and Cognitive Impairments in Rats. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. Vol. 20(7), p. 550-561, 2017.

SRINIVASAN, K. *et al.* Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 313–20, 2005.

STUEHR, D.J.; NATHAN, C.F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 1543-1555, 1989.

TALADRID, D. *et al.* Grape Pomace as a Cardiometabolic Health-Promoting Ingredient: Activity in the Intestinal Environment. **Antioxidants**. v.12, n.4, p.1-24, 2023.

TAO, L.C. *et al.* Triglyceride-glucose index as a marker in cardiovascular diseases: landscape and limitations. **Cardiovascular Diabetology**. doi: 10.1186/s12933-022-01511-x

TEIXEIRA, A. *et al.* Molecular and enological characterization of Touriga Nacional non-Saccharomyces yeasts. **Journal of Applied Microbiology**. V. 118, n. 3, p.658-671, 2015.

TRALHÃO, Guida Maria da Silva. **Propriedades antioxidantes e compostos bioativos em vinhos portugueses monocasta**. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Qualidade Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade NOVA de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2015.

URQUIAGA, I. *et al.* Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: a randomized controlled trial. **Biological Research**. V.48, n .1, p.1-10, 2015.

URQUIAGA, I. *et al.* The Consumption of Beef Burgers Prepared with Wine Grape Pomace Flour Improves Fasting Glucose, Plasma Antioxidant Levels, and Oxidative Damage Markers in Humans: A Controlled Trial. **Nutrients**. V.10, n.10, p.1-15, 2018.

VALENÇA, T.V.R. *et al.* Obesidade, diabetes e hipertensão associados a dislipidemia e dano hepático. **Revista saúde integrada**, v. 11, n. 22, p.1-18, 2018.

YANG, T. *et al.* Alteration of antioxidant enzymes and associated genes induced by grape seed extracts in the primary muscle cells of goats *in vitro*. **PLoS One**, v.9, n.9, p.1-9, 2014.

YARIBEYGI, H. *et al.* Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. V.2020, p.1-13, 2020.

YONAMINE, C.Y. *et al.*, Resveratrol Improves Glycemic Control in Type 2 Diabetic Obese Mice by Regulating Glucose Transporter Expression in Skeletal Muscle and Liver. **molecules**. v.22, n.7, p.1-13, 2017.

ZAMBIAZI, R.C. . **Análise Físico Química de Alimentos**. 1. ed. Pelotas: UFPel, 2010. v. 1. 202p.

ZEMDEGS, J. *et al.* Metformin promotes anxiolytic and antidepressant-like responses in insulin-resistant mice by decreasing circulating branched-chain amino acids. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n.30, p.5935-5948, 2019.

ZGLEJC-WASZAK, K. *et al.* Novel insights into the nervous system affected by prolonged hyperglycemia. **Journal of Molecular Medicine**. v.101, n.8, p.1015-1028, 2023.

ZHANG, J. *et al.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-18, 2016.

ZHANG, P. *et al.* Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. **Frontiers of medicine**. V.14, n.5, p.583-600, 2020.

ZHAO, J. *et al.* TyG index is positively associated with risk of CHD and coronary atherosclerosis severity among NAFLD patients. **Cardiovascular Diabetology**. doi: [10.1186/s12933-022-01548-y](https://doi.org/10.1186/s12933-022-01548-y)

ZHENG, Y.; LEY, S.H.; HU, F.B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**. V.14, p.88-98, 2018.

ZHOU, Z. *et al.* Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. V. 12, p.1-15, 2022.

Anexo 1 - Carta de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA-UFPeI)



PARECER Nº 6/2023/CEUA/REITORIA
PROCESSO Nº 23110.033578/2022-14

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos bioquímicos e metabólicos da administração de farinha do bagaço de uvas em modelo animal de diabetes tipo 2 e dislipidemia”, registrada com o nº 23110.033578/2022-14, sob a responsabilidade de Rejane Giacomelli Tavares - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início: 10/02/2023 Término: 26/09/2026
Espécie/linhagem/raça	<i>RattusNorvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	160
Idade	60 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas- Campus Capão do Leão.

Anexo 2 - Artigo de revisão

Grape Pomace Flour: from winemaking by-product to sustainable alternative for health benefits

Publicado na Revista *Biomedical and Biopharmaceutical Research* em 31 de dezembro de 2022

BBR Article Model (EN / PT)

(Please see also the guidelines at <http://www.alies.pt/en/authors/guidelines-for-authors.html> and <http://www.alies.pt/en/authors/ethics-and-good-publication-practice.html>)

Title EN: GRAPE POMACE FLOUR METABOLIC EFFECTS: A REVIEW OF PRE-CLINICAL AND CLINICAL BIOLOGICAL TRIALS

Short Title EN: Review of metabolic effects of grape pomace flour

Authors/Autores (include appropriate affiliations and emails for each author/ incluir afiliações e e-mails apropriados para cada autor):

Order	Surname	Name	Email	Affiliation/ Afiliação
1 ^{st/a}	Piccoli	Raphaella Cassol	raphaelacassol@gmail.com	1
2 ^{st/a}	Pereira	Paula	P1204@ulusofona.pt	2, 3, 4
3 ^{st/a}	Nicolai	Marisa	marisa.nicolai@ulusofona.pt	2
4 ^{st/a}	Palma	Maria Lídia	lidia.palma@ulusofona.pt	2
5 ^{st/a}	Stefanello	Francieli Moro	fmstefanello@gmail.com	5
6 ^{st/a}	Tavares	Rejane Giacomelli	tavares.rejane@gmail.com	1, 2, 5*

Affiliation/Afiliação:

¹ Postgraduation Program in Food and Nutrition, College of Nutrition, Federal University of Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brazil.

² Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

³ Center for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal;

⁴ EPCV-ULHT-Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

⁵ Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Science (CCQFA), Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil.

* corresponding author

e-mail: tavares.rejane@gmail.com

Abstract (maximum of 200 words)

Grape pomace is a by-product of the industry that despite its substantial bioactive compounds content is vastly discarded during winemaking process. The present review aimed to summarize recent evidence on the biological, metabolic, nutritional and sensory properties of grape pomace flour (GPF) supplemented foods or administration to different animal models. In this sense, the search was carried out in the electronic databases “PubMed” and “Google Scholar” and comprised studies that used grape pomace as its totality for the flour productions and full article publications. GPF demonstrated a high dietary fibre and polyphenolic content that caused notable changes in organoleptic characteristics such as the colour and texture of fortified foods and metabolic features. Were observed, for example, improvement of antioxidant and glycemic profile and a decrease in blood pressure, in preclinical and clinical studies, which suggests GPF as a possible agent for fortifying foods and promoting health

40 **Keywords** (maximum of five): grape pomace flour; fortified foods; phenolic compound; dietary fibre;
41 waste management.

42 **Introduction**

43
44
45 Grapes (*Vitis vinifera*) are one of the most extensively cultivated crops all around the world.
46 According to the International Organization of Vine and Wine (1) the World's annual production of
47 fresh grapes in 2019 was about 85 million of tons. Over 50% of the harvest of this product is used in
48 wine production. After the juice extraction, approximately 25% of the processed grape is essentially a
49 solid waste named as wine pomace or grape pomace (GP) (2,3). This residue results from the pressing
50 of fresh grapes, whether fermented or not during the winemaking process, composed of pressed grapes,
51 peels, seeds, small pieces of stalks, and yeast cells (3-5).

52 Although GP presents different uses such as fertilizing, being raw material for the production of
53 alcoholic beverages and animal feed (3), annually a large amount of this grape by-product is deliberately
54 discarded by the industry and poses serious problems for the environment such as pollution of ground
55 and surface water. On the other hand, GP contains significant amounts of dietary fibre and
56 phytochemicals such as flavanols, catechins, anthocyanins, stilbenes and phenolic acids, that remains
57 on the pomace after the winemaking process (6,7).

58 In the regard of environmental context, the most sustainable alternative of reuse of GP seems to
59 be in the form of grape pomace flour (GPF), which is obtained after bagasse drying and milling (5).
60 Recently, GPF has been the protagonist of studies that investigate its effects on the attenuation of insults
61 in the metabolism and promotion of health and deals with the possibility of using it as the fortification
62 ingredient in food through the improvement of sensory properties or increasing the nutritional value.
63 (7).

64 Thus, the aim of this review is to summarize recent evidence on the biological, metabolic,
65 nutritional and sensory properties of GPF supplemented foods or administration to different animal
66 models.

67

68 **Materials and Methods**

69 *Data sources and search strategy*

70 The present review was carried out from the search for articles indexed in the electronic databases
71 PubMed and Google Scholar using the English descriptors "grape pomace flour" and "grape pomace".
72 An evaluation of the bibliographic references of the selected articles was also carried out to identify
73 other potentially relevant studies.

74 *Inclusion and exclusion criteria*

75 The inclusion criteria were: 1. Studies that investigated metabolic, biochemistry, sensorial or
76 physicochemical aspects of administration, or formulation of products with grape pomace flour; 2.
77 Grape pomace used as its totality (not isolating a single part of the pomace); 3. Publication as a full
78 article. Were excluded all the articles that did not attend to the inclusion criteria.

79 *Study selection*

80 The selection of articles included in this review followed the sequence: 1. Launching of
81 descriptors in the databases; 2. Selection by titles; 3. Reading the abstracts of the articles that were

82 selected by the title (pre-selection); 4. Full reading of articles pre-selected by abstract 5. Inclusion of
83 articles with relevant data.

84 **Results and Discussion**

85 *General characteristics*

86 Tables 1, 2 and 3 presents the main characteristics and results of the studies that were included in
87 the present review and are divided according to the study design, as follows: pre-clinical studies,
88 observational studies and sensory evaluation of foods, respectively. The studies were published between
89 2014 and 2021. Four of the studies were conducted in Chile, three in Brazil, two in Portugal, one in
90 Tunisia, one in Thailand, one in the United States and one in Spain. The studies used different grape
91 varieties to make the flours and the respective compositional evaluations are described in each of the
92 works.

93 *Preclinical studies*

94 Charradi *et. al.* (2017) (8) reported the potential anti-lipotoxic effect of a high dosage of grape
95 seed and skin flour (GSSF) into the brain of either female or male obese rats induced by a high fat diet
96 (HFD), with an emphasis on the putative protection against lipotoxicity-induced oxidative stress and
97 inflammation. Animal's diet was mixtured with 5% of the GSSF for eight weeks. At the end of the
98 experimental period, the authors could observe that this supplementation resulted in a protection against
99 the increase of LDL-cholesterol accumulation in plasma and brain, lipoperoxidation, protein
100 carbonylation and decrease of antioxidant activity caused by the HFD. GSSF also abrogates the
101 disturbances caused by the HFD in transition metals and associated enzymes, intracellular mediators
102 and associated enzymes, peripheral adipokines and lipid brain deposition. And, although HFD alters
103 more significantly brain lipotoxicity in male than female rats, being gender dependent, the less
104 probability of females on developing inflammatory related brain diseases is suggested to be linked with
105 the anti-inflammatory role of estrogens. However, the GSSF supplementation protected efficiently both
106 sexes.

107 An experimental study designed by Souza *et al.* (2019) (9) evaluate whether dietary
108 supplementation with GPF was able to prevent or reduce the hepatic oxidative damage of grass carp
109 (*Ctenopharyngodon idella*) experimentally infected by *Pseudomonas aeruginosa*. In this sense, the
110 authors included 150 and 300 mg/kg of GPF on the fish's basal diet. The experiment resulted in the
111 increase of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system due to a significant up
112 regulation on hepatic enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activities and on
113 hepatic total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) levels, demonstrating a high capacity
114 to scavenge the peroxy radical. Additionally, the levels of reactive oxygen species (ROS), metabolites
115 of nitric oxide (NOx) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of the treated animals
116 remained similar to the control groups, whether the non-treated showed significant higher concentrations
117 of those markers, demonstrating that the prophylactic supplementation was able to protect the liver
118 against oxidative damage.

119 According to the literature, several evidence has demonstrated that the bioactive compounds of
120 grapes exert hepatoprotective effects and, sometimes via synergetic action. Even so, resveratrol which
121 is the main component of red grape, is considered the main responsible for the antioxidant actions that
122 can be observed in these crops (10). Among the resveratrol means of action are the suppression of
123 ROS synthesis by inhibiting enzyme depletion or by chelating trace elements involved in free radical

124 production, scavenging ROS and up-regulating or protecting the antioxidant defence and activating
125 defence pathway factors (9).

126 Also in 2019, Alba et al. (11) conducted an experimental design to evaluate the effects of GPF on
127 antioxidant activity, biochemistry variables, components of the immune system and milk production and
128 quality of Lacaune sheep in heat stress. The animals received 0.8 kg/day of a concentrate of 1 or 2% of
129 GPF, divided in two daily. The authors could demonstrate that the concentrate supplementation resulted
130 in an elevated antioxidant response in the serum of the sheep. Besides, serum levels of urea and glucose
131 were reduced while serum triglyceride concentrations were greater in animals supplemented with 2%
132 GPF.

133 This study could demonstrate that the experimental administration of GPF resulted in greater
134 control of oxidative stress, an increase in productive efficiency and improvement on sheep health. In
135 this sense, it could be observed that the increased serum concentrations further support the upregulation
136 in antioxidant capacity in the milk after the GPF administration, which is related to antioxidants, such
137 as quercetin, resveratrol and phenols that constitutes the grape chemical composition. Besides, the
138 authors assume that the increase in productive efficiency after the inclusion of GPF may be a result of
139 the greater control of oxidative stress and decrease of free radicals concentration. In addition, it is
140 hypothesized that as the GPF supplementation exerted a protection against milk lipid peroxidation, it
141 could potentially increase shelf life of milk and its derivative products (11).

142 Recently, in 2021, Harikrishnan et al.(12) evaluated the effects of dietary inclusion of GPF on
143 growth and antioxidant and anti-inflammatory profile, innate-adaptive immunity, and immune genes
144 expression in *Labeo rohita* against *Flavobacterium columnaris*. The animals were separated in four
145 different groups which received 0, 100, 200, or 300 mg/kg of the GPF supplemented on the basal diet.
146 After the 60 days experimental protocol, the authors could observe that the 200 mg/kg GPF inclusion
147 diet exhibited the most significant results on growth rate, antioxidant status, and immune defense
148 mechanisms than other concentrations of the flour. In this sense, there was a significant increase of as
149 malondialdehyde (MDA), SOD, glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), phagocytic (PC)
150 activity, respiratory burst (RB), alternative complement pathway (ACP), lysozyme (Lyz), and total
151 immunoglobulin M (IgM) on the groups with the higher concentration of the grape supplement.
152 According to the present work, GPF was capable of improving the antioxidant enzymatic and non-
153 enzymatic pathway through the increase of enzymes accompanied by a balance between synthesis and
154 exclusion of ROS.

155 In 2019, Rivera et al.(13) headed an experimental study in order to investigate the impact of a
156 dietary supplementation of GPF in a model of lethal ischemic heart disease. In this sense, male and
157 female SR-B1 KO/ApoER61^{h/h} were administrated 20% high fat, high cholesterol, and cholic acid-
158 containing atherogenic diet mixture to the basal diet, 20% red wine pomace flour (RWPF) plus the
159 experimental diet or 10% of oat fibre plus the atherogenic diet. After the experimental protocol, the
160 authors could observe that RWPF supplementation showed a significant improvement on animal
161 lifespan in comparison to the groups that did not receive the flour. When analyzing the plasma
162 antioxidant capacity of the RWGP, the authors could observe that it decreased the levels of
163 dihydrorhodamine (DHR) oxidation to baseline, while the experimental diet exerted an increase of more
164 than 100% at this parameter. Finally, the authors evaluated heart disturbances caused by the
165 administration of an atherogenic diet and the potential effects of the RWGP supplementation. In this
166 sense, the flour-fed group showed less formation of atherosclerotic plaques and Oil Red O-stained areas
167 at the end of the experiment and a significant restoration of systolic heart function at day 14 to normal
168 levels.

169 The findings elucidated by Rivera et al. 2019 (13) showed that more than increasing mice lifespan,
170 RWGP consumption were associated with a significant reduction in atherosclerotic lesions and ischemic
171 heart disease and exhibited an antioxidant effect. The results found by the present article indicates that
172 the effect of RWGP on a diversity of targets is not only related to the abundant presence of fibres ever
173 since the oat fibre-fed group did not demonstrate the same effects as the flour-fed but it was most likely
174 due to specific components of the RWGP flour.

175 In 2015, Hernández-Salinas et al. (14) performed a study to investigate whether wine grape
176 pomace (WGP) supplementation may prevent the disturbances caused by a high fructose diet-fed animal
177 model of metabolic syndrome on glucose metabolism and oxidative stress of rats. In this sense, the
178 animals were fed with a control diet, control diet plus 20% of WGP, control diet plus 50% of a high
179 fructose diet or 50% high fructose diet plus 20% of WGP. The authors then measured blood glucose,
180 insulin and triglycerides, arterial blood pressure and body weight. Also, homeostasis model assessment
181 (HOMA) index was calculated, glucose tolerance test was performed, and oxidative stress index were
182 measured in plasma and kidney. At the end of the experimental protocol the authors could observe that
183 WGP supplementation was able to prevent the increase of TBARS levels in plasma and renal tissue
184 caused by the administration of a high fructose diet. Furthermore, it also prevented the increase of
185 HOMA index, fasting blood glucose and plasma insulin levels when compared to non-treated
186 intervention group. Previous studies on the literature have already showed that dietary polyphenols may
187 attenuate system inflammation through the modulation of the activities of key transcription factors that
188 regulate cellular responses to oxidative stress and inflammation (15)

189 *Clinical/observational human model studies*

190 In 2015, Urquiaga et al. (16) designed a prospective, randomized controlled parallel-group trial
191 to evaluate the effect of wine grape pomace flour (WGPF) on components of metabolic syndrome (MS)
192 in humans. In this sense, were recruited male volunteer workers who regularly consumed an omnivorous
193 diet and presented at least one component of MS. After the selection of the participants of the study,
194 they were randomly assigned to either group intervention or control. Both groups were asked to maintain
195 their regular eating and lifestyle habits, with the exception to the intervention group that were also
196 oriented to consume 20 g of WGPF/day during the 16 weeks of the study. WGPF was consumed in
197 bread, biscuits or diluted to water. Participants passed through clinical, nutritional, anthropometric and
198 laboratory evaluations at the beginning and end of the study. In this sense, at the end of the study, the
199 authors could observe that the control group showed a statistically significant increase in body mass
200 index, while no significant differences were observed on anthropometric characteristics of the
201 intervention group. WGPF consumption resulted in a significant decrease of systolic and diastolic blood
202 pressure, fasting glucose levels and protein damage measured as carbonyl groups in plasma proteins,
203 while γ -tocopherol, δ -tocopherol and α -tocopherol increased significantly in WGPF supplemented
204 group.

205 More recently, in 2018, Urquiaga et al. (17) designed a three-month longitudinal trial consisting
206 of two treatment periods of four weeks, separated by a third four-week wash-out period. Were recruited
207 volunteer male workers who regularly consumed an omnivorous diet and presented at least one
208 component of MS and a body mass index (BMI) between 25.0 and 39.9 kg/m². Participants were asked
209 to maintain their regular eating habits and lifestyle during the study, except for the daily intake of
210 WGPF-burgers containing 7g of WGPF during the first and last four weeks of the experimental protocol.
211 Participants had clinical, nutritional, and anthropometric evaluations at the beginning and end of the
212 study. After the 16 weeks, the authors could observe that WGPF-burger consumption resulted in a
213 significant decrease on glycemia and HOMA index value throughout the experimental period and

214 remained low during the washout period. According to plasma insulin, it could be observed a decrease
215 trend during the WGPF-burger period that remained low during the washout period. According to
216 plasma antioxidants, WGPF-burgers consumption period resulted in a increased concentration of
217 vitamin C and decrease of plasma uric acid levels and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) radical
218 scavenging capacity. In addition, WGPF-burgers consumption exerted a significant decrease on
219 Advanced oxidation protein products (AOPP) and oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) levels.

220 At both studies, the authors could observe a reduction on fasting glucose levels and, besides GPF
221 are rich in antioxidant dietary fibre, which is a known substance that is resistant to digestion by human
222 gastrointestinal enzymes, there is already evidence relating its consumption to an improvement on
223 carbohydrates metabolism. However, the mechanism associated with these beneficial
224 effects are not yet known and it is hypothesized that the dietary fibre acts in synergism with the phenolic
225 content of GPFs (17). In addition, it could be observed a statistically significant lowering of blood
226 pressure after WGPF intake. Previous data from the literature associate the consumption of grape
227 extracts, which are rich on phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, stilbenes, and lipids with
228 antihypertensive effects and, consequently, cardio protector features (18). Additionally, fibre-associated
229 antioxidant products that are released by colonic fermentation might explain the reduction in blood
230 pressure that was observed after WGPF supplementation (16).

231 According to the results observed by Urquiaga et al. 2015 and 2018 (16,17), WGPF consumption
232 led to increased antioxidant defenses and a reduction on oxidative and protein damage markers, what
233 enhances the antioxidant capacity of grapes as previous related on the literature (18). Finally, some of
234 the participants reported side effects during the experimental protocol when they were oriented to
235 consume WGPF such as an increase of intestinal gas, heartburn, regularization of intestinal transit, softer
236 stools, increased appetite, dyspepsia and gastroesophageal reflux (16). Although WGPF consumption
237 demonstrated beneficial effects on human individuals as described on the previous studies included on
238 this review, the authors highlights that there was some limitations on those studies such as: the low
239 number of participants that were able to finish the protocol, the bias that might have occur due to the
240 open-label scope of the protocols, the differences of calorie intake and dietary composition of each
241 participant that influences the final results mentioned above (16,17), which enforces the need of
242 developing new studies that involve a bigger number of participants and investigate different features
243 such as diabetes and cardiovascular diseases on human scopes in order to better understand the potential
244 effects of GPFs supplementation.

245 *Applications of grape pomace flour on food industry*

246 In 2020, Palma et al. (5) performed a sensory evaluation of salty crackers fortified with GPF at
247 percentages of 5 and 10%. Participants received five different formulations of crackers: Arinto variety
248 flour (5 and 10% incorporated to wheat flour), Touriga Nacional variety flour (5 and 10% incorporated
249 to wheat flour) and the same formulation, without GPFs, were used as a control. The attributes evaluated
250 by the volunteers were: colour, aroma, flavor, texture and overall impression through a 5-point hedonic
251 scale. In addition, the intention to purchase were also parameterized according to a 5-point scale and
252 participants were asked to choose which of the crackers they “best like” and the one they “least like”.

253 At the end of the sensory evaluation, the authors could observe that the Arinto 10% cracker had
254 the highest scores of colour, flavor, texture, global appreciation and purchase intention when compared
255 to the rest of the crackers, although none of this results are statistically significant. Additionally, it could
256 be observed that the formulations with the lowest concentrations of GPFs were the less appreciated by
257 the participants (Arinto 5% and Touriga 5%). Finally, the most and least liked crackers choice question

258 resulted in a highest number of votes to Touriga Nacional 10% as the “best like” cracker and Touriga
259 Nacional 5% as the “least like” one.

260 In the same way, in 2021, Palma et al. (19) aimed to evaluate the acceptability of sweet cookies
261 fortified with Arinto or Touriga Nacional pomace flours, on higher concentration and at a bigger scope
262 of volunteers than the previous work. Participants received five different formulated cookies: Arinto
263 variety flour at the concentrations of 15 and 20%, Touriga Nacional variety flour at the concentrations
264 of 15 and 20% and control cookies without GPFs supplementation. The tests were performed in two
265 different days and the participants received a questionnaire to give their opinion regarding colour, taste
266 texture, aroma and overall final impression, purchase intention and their preference of sweet cookie in
267 which participants were asked to rank the cookies as “liked best”, “more or less liked” and “liked least”.

268 At this time, the authors could observe that regarding to colour, flavor and purchase intention the
269 highest scores were attributed to the control cookie. Meanwhile, both Touriga Nacional flour
270 formulations had the lowest punctuation related to colour and 15% Touriga Nacional flour of flavor. On
271 the other hand, 15% Touriga Nacional flour fortified cookies had the highest scores of texture and both
272 20% fortified cookies had the lowest score of flavor. According to the purchase intention, the highest
273 percentages were attributed to Arinto GPF incorporations of 15 and 20% and the cookies with the lowest
274 intention of purchase were the control ones. Finally, the preferences of choice demonstrated that the
275 most appreciated cookie was the control, and among the fortified cookies, the highest scores were from
276 Touriga Nacional 15 and 20% followed by Arinto 20 and 15%.

277 Ortega-Heras et al. 2019 (20) designed a study to evaluate the adequacy of sensory attributes,
278 nutritional, colour and texture proprieties of muffins fortified with red and white GPF. For that, five
279 formulations of muffins were analyzed: a control muffin composed with 100% whole-wheat flour and
280 muffins made with 10 and 20% of white or red GPF (free of seeds). For the sensory analysis, participants
281 received one cookie of each formulation and were asked to indicate the degree of liking using a nine-
282 point hedonic scale, ranged from “disliked extremely” to “like extremely”. The evaluated attributes were
283 surface colour, crumb colour, sweetness, hardness, sponginess and flavour using a five-point bipolar
284 scale. In addition, were evaluated the nutritional composition, height increase and weight loss, colour
285 and texture profile analysis of the muffins, according to each previous proposed methodology.
286 According to the nutrition composition of the muffins, it could be observed that the GPFs fortifies
287 muffins presented a higher content of fibre and fat when compared to control muffins, whereas control
288 muffins showed the highest height increase and 20% fortified muffins exhibited the highest scores of
289 weight loss. Regarding to colour and texture parameters, the muffins elaborated with GPFs were darker
290 and harder when compared to the control muffin. Over more, the addition of GPFs resulted in a increase
291 of chewiness when compared to control muffins and a decrease of resilience as the concentration of
292 GPFs increased. Finally, the concentrations of 20% of GPFs underwent a significant reduction of
293 springiness of muffins.

294 After the sensory analysis, the authors could observe that the most appreciated muffin were the
295 control one, followed by the 10% formulation of red and white GPFs. The organoleptic analyses showed
296 that reformulated muffins had “much more” colour and flavour, especially on the 20% red grape
297 formulation. According to the sweetness perception, it could be observed that white grape formulations
298 exhibited the highest scores of “much less” perception.

299 In 2014, Walker et al. (21) headed a study to evaluate the effects of fortification of baked good
300 with 5, 10 or 15% of Pinot Noir or Pinot Grigio grape flours. In this sense, the flours were added to
301 bread, muffins and brownies, the final products were then evaluated for total phenolic content, radical

302 scavenging activity, dietary fibre content and physicochemical and sensory proprieties. For the sensory
303 evaluation, the participants received 2 samples of each baked good and rated the likeness of established
304 parameters on a 9-point hedonic scale. Physicochemical properties and bioactive compounds analyses
305 were performed according to the stablished methodology to each parameter.

306 At the end of the experiment the authors could observe that WGP supplementation resulted in a
307 lower water holding capacity and a higher sucrose solvent retention capacity when compared to the
308 control formulation, which means that WGP absorbs less water than wheat flour and might present a
309 smaller loaf size from decreased extensibility due to its high fibre content, respectively. According to
310 the physicochemical properties of baked good items, the 20% white wine grape pomace (WWGP) 20%
311 sample had the highest moisture content, which could be explained to the higher sugar concentration in
312 WWGP. On the other hand, WWGP samples of 15 and 20% showed the lower water activity than the
313 other formulations, which probably be explained, again, due to sugars capacity of trapping available
314 water and decreasing the water content available to participate on chemical reactions. According to the
315 brownie samples, the RWGP 25% had a significantly higher moisture content when compares to the
316 control formulation, while the water activity was the lowest for the 15 and 25% RWGP samples.

317 Regarding to colour, the WGPs formulated baked goods became darker as the percentage of flour
318 increase, being the RWGP a dark purple to red colour and the WWGP a yellow brown colour that could
319 be observed on the bakery products. In addition, all WGP fortified muffins and breads presented a lower
320 loaf volume and an increase in chewiness and firmness when compared to the control formulation, while
321 the control muffins presented a significantly higher springiness than all other WGP fortified samples.

322 Regarding the bioactive composition, it could be observed that the total phenolic content and
323 radical scavenging activity of breads increased as the WGP percent raised as well. For the muffins, the
324 total phenolic content followed the same trend as the increase of WGP was presented, except that the
325 WWGP samples had significantly lower radical scavenging values when compared to RWGP ones.
326 Similarly, the radical scavenging activity of brownies was only significantly higher on 10 and 25%
327 RWGP fortified samples. As for the dietary fibre content, there was a trend of increase as the percentage
328 of GPFs increased as well.

329 Finally, the consumer acceptance of RWGP fortified baked good demonstrated that 5 and 10%
330 breads presented a lower rating for mouth feel, what suggests that these samples was a little dry, as
331 expected after the water activity and holding. Regarding the muffin samples, the 5% formulation
332 presented the most acceptable colour as the 10% demonstrate significantly higher scores and the control
333 lower, indicating that these samples were too dark and light, respectively. As for the aroma liking rating,
334 the 5% RWGP muffins presented the highest scores of the fortified samples, while the most appreciated
335 was the control one. For the brownies, the less appreciated sample for texture liking was the 20% RWGP,
336 which according to the panelists, presented big particle size of the pomace, what interfered on this
337 attribute.

338 In 2019, Cilli et al. (22) headed a study aiming to investigate the antioxidant potential of GPF in
339 a frozen salmon burger. In this sense, volunteers were recruited to attend to a sensory evaluation in
340 which received approximately 10 g of three different formulated burgers: the control negative, and 1 or
341 2% supplementation of GPF on fish burgers that were evaluated through its colour, odour, taste, texture,
342 appearance and overall quality using a 9-point verbal hedonic
343 scale. Participants also were asked to give their opinion on the purchase intention using a 5-point scale.
344 The researchers also analyzed its TBARS content and *in vitro* cytotoxicity of GPF through previous
345 established methodology. According to the cytotoxicity, the GPF showed a good cytocompatibility

346 when exposed to mouse fibroblasts cells, exerting cytotoxic effects only at 800 mg of GPF/ml, which
347 means that the 1 and 2% formulations of burgers are safe as represents 100 and 200 mg of GPF/ml,
348 respectively. The proximate composition of the burgers showed that GPF addition improved the dietary
349 fibre content and darkness when compared to control sample. As for the sensory evaluation of salmon
350 burgers, the researchers could observe that the supplementation of GPF was less appreciated for
351 appearance, colour, and overall quality of salmon burgers as compared to the negative control. In
352 general, the 1% GPF formulation of burger was more accepted by the consumers and presented a higher
353 purchase intention when compared to the 2% samples. Finally, the authors could observe that GPF
354 supplementation on burgers resulted in a decrease of TBARS content during storage without negatively
355 compromising the nutritional or microbiological characteristics.

356 Based on the results presented by the previous mentioned studies, it could be observed that
357 different concentrations of GPFs on different recipes of baked goods (salty and sweet ones) and burger
358 demonstrated a heterogeneous preference for the control or fortified samples and each percentage of the
359 flour. In general, the addition of GPFs interferes on the organoleptic characteristics such as colour, in
360 which the final product tends to be darker as the percentage of flour increase and to present a feature
361 similar to the grape cast, which means that it acquires a purple to red colour when fortified with RWGP
362 and a yellow to brown colour when added the WWGP flours. The capacity of GPF to influence on the
363 colour of the products represents a beneficial attribute because, according to the literature, the consumers
364 tend to associate darker baked goods as healthier ones, being those the preference choice when seeking
365 for a functional food (21). Furthermore, GPF presented a higher content of dietary fibre when compared
366 to the control formulations investigated on the studies mentioned before, increasing as the percentage
367 of GPF raised as well. According to the literature, dietary fibre intake is associated with decreased risk
368 of cardiovascular disease (23) and other chronic diseases, in addition to a association with lower body
369 weights, what represents benefits to health (24).

370 Furthermore, the chemical composition analyses demonstrated that GPFs are rich in polyphenols
371 and bioactive compounds, as its concentrations were generally higher than the ones found on control
372 formulations. As for the final products the phenolic composition tends to increase as the percentage of
373 GPF raised. Another characteristic of fortified baked goods is the hardness and chewiness, in which the
374 panelists indicated that those samples presented a dryer texture, what can be explained for the flours'
375 lower water activity and water retention, which results in incomplete hydration of the flour and might
376 attribute its harder texture (21).

377 Finally, the authors could observe that sometimes however a fortified baked good presented lower
378 score than the control samples when analyzing single characteristics such as colour and texture, the same
379 samples could achieve higher values of purchase intention or likeness. According to the literature, it
380 could be explained as consumers not always answer to "like and dislike" questions the same as specific
381 ones due to emotional influence (5,19). In this sense, it is emphasized the need of evaluating the same
382 formulation with different methods and the necessity of new studies investigating different
383 concentrations and preparations using GPF and a bigger scope of volunteers to better understand general
384 preferences for the introduction of its consumption as a functional food.

385

386 **Conclusion**

387 GPF is an important source of bioactive compounds with healthy promoter activities such as
388 antioxidant, cardio protector and anti-hyperglycemic. Recent evidence is demonstrating that this by-
389 product may play an important effect on the optimization of health benefits and minimizing possible

390 negative health markers. In addition, the incorporation of fibre-rich GPF on different recipes results in
391 higher nutritional value and sensory properties of the final product. Although there are preclinical and
392 clinical studies observing that some mechanisms played by its chemical composition may act as cardio
393 and neuroprotective, more investigations regarding the targets and pathways by which the effects of
394 GPF flour can act in order to improve health and food nutritional quality are needed to better understand
395 its molecular interaction on systemic biochemical parameters and food shelf life and sensory
396 characteristics.

397

398 **Authors Contributions Statement:**

399 RCP - study design, data analyses, writing

400 PP - supervision, revision

401 MN- supervision, revision

402 MLP -supervision, revision

403 RGT - study design, supervision, final revision

404

405 **Conflict of Interests**

406 The authors declare that there is no financial or personal relationship that could present a potential
407 conflict of interests.

408 **References/Bibliography - Referências / Bibliografia**

- 409 1. OIV, “International Organisation of Vine and Wine,” Report, 2019, [Online]. Available:
410 <http://www.oiv.int/>. [Accessed: 15-set-2022].
- 411 2. Özvural, E.B. & Vural, H. (2014) Which is the best grape seed additive for frankfurters: extract, oil
412 or flour? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 792–
413 797. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6442>
- 414 3. Garcia-Lomillo, J. & Gonzalez-Sanjos, M.L. (2017) Applications of Wine Pomace in the Food
415 Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews on Food Science and Food Safety*.
416 16(1), 3-22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>
- 417 4. Averilla, J. N., Oh, J., Kim, H.J., Kim, J.S. & Kim, J-S. (2019) *Potential health benefits of phenolic*
418 *compounds in grape processing by-products. Food Science and Biotechnology*.28(6),1607-1615.
419 <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00628-2>
- 420 5. Palma, M.L., Nunes, M.C., Gameiro, R., Rodrigues, M., Gothe, S., Tavares, N., Pego, C., Nicolai,
421 M. & Pereira, P. (2020) Preliminary sensory evaluation of salty crackers with grape pomace flour.
422 *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 17(1), 33-43. doi: 10.19277/bbr.17.1.222
- 423 6. Šporin, M., Avbelj, M., Kovač, B. & Možina, S.S. (2018) Quality characteristics of wheat flour
424 dough and bread containing grape pomace flour. *Food Science and Technology International*.
425 24(3),251-263. doi:10.1177/1082013217745398
- 426 7. Antičić, B., Jančiková, S., Dordević, D. & Tremlová, B. (2020) Grape Pomace Valorization: A
427 Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*. 9(11), 1-20. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>
- 428 8. Charradi, K., Mahmoudi, M., Bedhiafi, T., Kadri, S., Elkahoui, S., Limam, F. & Aouani, E. (2017)
429 Dietary supplementation of grape seed and skin flour mitigates brain oxidative damage induced by a
430 high-fat diet in rat: Gender dependency. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 87, 519-526. doi:
431 [10.1016/j.biopha.2017.01.015](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.015)
- 432 9. Souza, C.F., Baldissera, M.D., Descovi, S.N., Zeppenfeld, C.C., Verdi, C.M., Santos, R.C.V., Silva,
433 A.S. & Baldisserotto, B. (2019) Grape pomace flour alleviates *Pseudomonas aeruginosa*-induced
434 hepatic oxidative stress in grass carp by improving antioxidant defense. *Microbial Pathogenesis*,
435 129, 271-276. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.024>

- 436 10. Peixoto, C. M., Dias, M.I., Alves, M.J., Calhella, R.C., Barros, L., Pinho, S.P. & Ferreira, I.C.F.R.
437 (2018). *Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. Food*
438 *Chemistry*.253, 132-138. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.163.
- 439 11. Alba, D.F., Campigotto, G., Cazarotto, C.J., Santos, D.S., Gebert, R.R., Reis, J.H., Souza, C.F.,
440 Baldissera, M.D., Gindri, A.L., Kempka, A.P., Palmer, E.A., Vedovatto, M. & Silva, A.S. (2019)
441 Use of grape residue flour in lactating dairy sheep in heat stress: Effects on health, milk production
442 and quality. *Journal of Thermal Biology* 82, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.04.007>
- 443 12. Harikrishnan, R., Devi, G., Doan, H.V., Balasundaram, C., Esteban, M.A. & Abdel-Tawwab, M.
444 (2021) Impact of grape pomace flour (GPF) on immunity and immune-antioxidant-anti-
445 inflammatory genes expression in *Labeo rohita* against *Flavobacterium columnaris*. *Fish and*
446 *Shellfish Immunology*. 111, 69–82. doi: 10.1016/j.fsi.2021.01.011.
- 447 13. Rivera, K., Salas-Pérez, F., Echeverría, G., Urquiaga, I., Dicenta, S., Pérez, D., de la Cerda, P.,
448 González, L., Andia, M.E., Uribe, S., Tejos, C., Martínez, G., Busso, D., Irrarázaval, P. & Rigotti,
449 A. (2019) Red Wine Grape Pomace Attenuates Atherosclerosis and Myocardial Damage and
450 Increases Survival in Association with Improved Plasma Antioxidant Activity in a Murine Model of
451 Lethal Ischemic Heart Disease. *Nutrients*. 11(9), 2135. 1-17. doi:10.3390/nu11092135
- 452 14. Hernández-Salinas, R., Decap, V., Leguina, A., Cáceres, P., Perez, D., Urquiaga, I., Iturriaga, R. &
453 Velarde, V. (2015) Antioxidant and anti hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a
454 high fructose diet. *Biological Research*. 48, 1-9. doi 10.1186/s40659-015-0045-4
- 455 15. Rudrapal, M., Khairnar, S.J., Khan, J., Dukhyil, A.B., Ansari, M.A., Alomary, M.N., Alshabrimi,
456 F.M., Palai, Deb, P.K. & Devi. R. (2022) Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-
457 Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s)
458 of Action. *Frontiers in Pharmacology*. 13, 1-15. doi: 10.3389/fphar.2022.806470
- 459 16. Urquiaga, I., Troncoso, D., Mackenna, M.J., Urzúa, C., Pérez, D., Dicenta, S., de la Cerda, P.M.,
460 Amigo, L., Carreño, J.C., Echeverría, G. & Rigotti, A. (2018) The Consumption of Beef Burgers
461 Prepared with Wine Grape Pomace Flour Improves Fasting Glucose, Plasma Antioxidant Levels,
462 and Oxidative Damage Markers in Humans: A Controlled Trial. *Nutrients*. 10(10), 1-15.
463 <https://doi.org/10.3390/nu10101388>
- 464 17. Urquiaga, I., D'Acuña, S., Pérez, D., Dicenta, S., Escheverría, G., Rigotti, A. & Leighton, F. (2015)
465 Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans:
466 a randomized controlled trial. *Biological Research*. 48 (1), 1-10. [https://doi.org/10.1186/s40659-015-](https://doi.org/10.1186/s40659-015-0040-9)
467 0040-9
- 468 18. Sabra, A., Netticadan, T. & Wijekoon, C. (2021) Grape bioactive molecules, and the potential health
469 benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chemistry*. 12, 1-13
470 <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100149>
- 471 19. Palma, M.L., Ferreira-Pêgo, C., Nicolai, M. & Pereira, P. (2021) Preliminary sensory evaluation of
472 grape pomace flour sweet cookies. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 18(1), 92-102. doi:
473 10.19277/bbr.18.1.249
- 474 20. Ortigas-Heras, M., Gómez, I., de Pablos-Alcalde, S. & González-Sanjosé, M.L. (2019) Application
475 of the Just-About-Right Scales in the Development of New Healthy Whole-Wheat Muffins by the
476 Addition of a Product Obtained from White and Red Grape Pomace. *Foods*, 8(8), 1-15.
477 doi:10.3390/foods8090419
- 478 21. Walker, R., Tseg, Aa., Cavender, G, Ross, A. & Zhao, Y. (2014) Physicochemical, Nutritional, and
479 Sensory Qualities of Wine Grape Pomace Fortified Baked Goods. *Journal of Food Science*, 79(9),
480 1811-1822. doi: 10.1111/1750-3841.12554
- 481 22. Cilli, L.P., Contini, L.R.F., Sinnecker, P., Lopes, P.S., Andreo, M.A., Neiva, C.R.P., Nascimento,
482 M.S., Yoshida, C.M.P. & Venturini, A.C. (2020) Effects of grape pomace flour on quality parameters

- 483 of salmon burger. *Journal of Food Processing and Preservation*. 44(2), 1-11.
484 <https://doi.org/10.1111/jfpp.14329>
- 485 23. Soliman, G.A. (2019) Dietary Fiber, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease. *Nutrients*. 11(5),
486 1-11. doi: 10.3390/nu11051155.
- 487 24. Dahl, W. & Stewart, M.L. (2015) Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Health
488 Implications of Dietary Fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 115(11), 1861-70.
489 doi: 10.1016/j.jand.2015.09.003.

490 **Legends, Tables and Figures / Legendas, Tabelas e Figuras**

491

492 **Tables**

493 **Table 1.** Detailed description of each preclinical study included in this review. (n=6)

494 GPF: grape pomace flour ; GRF: grape residue flour; GSSF: grape seed and skin flour; WGP: wine
495 grape pomace; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; LDL: low density lipoprotein;
496 ROS: reactive oxygen species; NOx: nitric oxide; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances;
497 mRNA: micro MDA: malondialdehyde; RB: respiratory burst; ACP: alternative pathway complement;
498 IgM: total immunoglobulin M; Lyz: lysozyme; TLR22: toll-like receptor-22; CC3: Complement C3;
499 Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NKEF- β : natural killer-cell enhancing factor β ;
500 housekeeping gene (β -actin); HFC: high fat, high cholesterol, and cholic acid-containing

501

502 **Table 2.** Detailed description of each observational study included in this review. (n=2)

503 AOPP: advanced oxidation protein products; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; oxLDL: oxidized
504 low-density lipoprotein; WGPF: wine grape pomace flour

505

506

507 **Table 3.** Detailed description of each sensorial study included in this review. (n=5)

508 RWGP: Pinot Noir wine grape pomace; WWGP: Pinot Grigio wine grape pomace

509

510

511 **Tabelas**

512 **Tabela 1.** Descrição detalhada de cada estudo pré-clínico incluído nesta revisão. (n=6)

513 GPF: farinha de bagaço de uva; GRF: farinha de bagaço de uva; GSSF: farinha de semente e casca de
514 uva; WGP: bagaço de uva para vinho; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; LDL:
515 lipoproteína de baixa densidade; ROS: espécies reativas de oxigênio; NOx: óxido nítrico; TBARS:
516 substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; mRNA: microMDA: malondialdeído; RB: explosão
517 respiratória; ACP: complemento de via alternativa; IgM: imunoglobulina M total; Lyz: lisozima;
518 TLR22: receptor-22 tipo toll; CC3: Complemento C3; Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao
519 fator 2; NKEF - β : fator β de aumento de células assassinas naturais ; gene de manutenção (β -actina);
520 HFC: alto teor de gordura, colesterol alto e ácido cólico

521

522 **Tabela 2.** Descrição detalhada de cada estudo observacional incluído nesta revisão. (n=2)

523 AOPP: produtos de proteína de oxidação avançada; DPPH: 2,2-difenil-1- picrilhidrazil; oxLDL :
524 lipoproteína de baixa densidade oxidada; WGPF: farinha de bagaço de uva para vinho

525

526 **Tabela 3.** Descrição detalhada de cada estudo sensorial incluído nesta revisão. (n=5)

527 RWGP: Bagaço de uva para vinho Pinot Noir; WWGP: Bagaço de uva de vinho Pinot Grigio

Portuguese Chapters

Título PT: EFEITOS METABÓLICOS DA FARINHA DO BAGAÇO DE UVA: UMA REVISÃO DE ENSAIOS BIOLÓGICOS PRÉ CLÍNICOS E CLÍNICOS

Título Curto PT: Revisão dos efeitos metabólicos da farinha de bagaço de uva

Resumo (máximo de 200 palavras)

O bagaço de uva é um subproduto da indústria que, apesar de seu conteúdo significativo de compostos bioativos, é amplamente descartado durante o processo de vinificação. A presente revisão teve como objetivo resumir evidências recentes sobre as propriedades biológicas, metabólicas, nutricionais e sensoriais de alimentos suplementados com farinha de bagaço de uva (GPF) ou administrados a diferentes modelos animais. Nesse sentido, a busca foi realizada nas bases de dados eletrônicas “PubMed” e “Google Scholar” e compreendeu estudos que utilizaram bagaço de uva como sua totalidade para as produções de farinha e publicações de artigos completos. A GPF demonstrou um alto teor de fibra alimentar e polifenóis que ocasionou mudanças notáveis nas características organolépticas, como cor e textura de alimentos fortificados, e parâmetros metabólicos. Foram observadas, por exemplo, melhora do perfil antioxidante e glicêmico e diminuição da pressão arterial, em estudos pré-clínicos e clínicos, o que sugere a GPF como um possível agente fortificante de alimentos e promotor de saúde.

Palavras-chave (máximo de cinco): farinha do bagaço de uva; alimentos fortificados; compostos fenólicos; fibra dietética; gestão de resíduos.

Introdução

A uva (*Vitis vinifera*) é uma das culturas mais cultivadas em todo o mundo. De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (1), a produção anual mundial de uvas frescas em 2019 foi de cerca de 85 milhões de toneladas. Mais de 50% da colheita deste produto é utilizada na produção de vinho. Após a extração do suco, aproximadamente 25% da uva processada é essencialmente um resíduo sólido denominado como bagaço de vinho ou bagaço de uva (GP) (2,3). Este resíduo é resultado da prensagem de uvas frescas, fermentadas ou não, durante o processo de vinificação, sendo composto por uvas prensadas, cascas, sementes, pequenos pedaços de galhos e células fermentadas (3-5).

Embora o GP apresente diferentes usos como na adubação, sendo matéria-prima para a produção de bebidas alcoólicas e ração animal (3), anualmente uma grande quantidade desse subproduto da uva é deliberadamente descartada pela indústria e traz sérios problemas ao meio ambiente, como poluição do solo e das águas. Por outro lado, o GP contém quantidades significativas de fibra alimentar e fitoquímicos como flavanóides, catequinas, antocianinas, estilbenos e ácidos fenólicos, que permanecem no bagaço após o processo de vinificação (6,7).

No que diz respeito ao contexto ambiental, alternativa mais sustentável de reaproveitamento do GP parece ser na forma de farinha de bagaço de uva (GPF), que é obtida após a secagem e moagem do bagaço (5). Recentemente, a GPF tem sido protagonista de estudos que investigam seus efeitos na atenuação de agravos ao metabolismo e na promoção de saúde e trata da possibilidade de utilizá-la como ingrediente fortificante em alimentos por meio da melhoria das propriedades sensoriais ou aumento do valor nutricional . (7).

Assim, o objetivo desta revisão é resumir evidências recentes sobre as propriedades biológicas, metabólicas, nutricionais e sensoriais de alimentos suplementados com GPF ou sua administração a diferentes modelos animais.

Fontes de dados e estratégia de pesquisa

A presente revisão foi realizada a partir da busca de artigos indexados nas bases de dados eletrônicas PubMed e Google Acadêmico utilizando os descritores em inglês “grape pomace flour” e “grape pomace”. Também foi realizada uma avaliação das referências bibliográficas dos artigos selecionados para identificar outros estudos potencialmente relevantes.

Crítérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: 1. Estudos que investigassem aspectos metabólicos, bioquímicos, sensoriais ou físico-químicos da administração ou formulação de produtos com farinha de bagaço de uva; 2. Bagaço de uva utilizado em sua totalidade (não isolando uma única parte do bagaço); 3. Publicação como artigo completo. Foram excluídos todos os artigos que não atendiam aos critérios de inclusão.

Seleção de estudos

A seleção dos artigos incluídos nesta revisão seguiu a sequência: 1. Lançamento dos descritores nas bases de dados; 2. Seleção por títulos; 3. Leitura dos resumos dos artigos selecionados pelo título (pré-seleção); 4. Leitura na íntegra dos artigos pré-selecionados pelo resumo 5. Inclusão de artigos com dados relevantes.

Resultados e Discussão

Características gerais

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam as principais características e resultados dos estudos que foram incluídos na presente revisão e estão divididas de acordo com o desenho do estudo, sendo: estudos pré-clínicos, estudos observacionais e avaliação sensorial de alimentos, respectivamente. Os estudos foram publicados entre 2014 e 2021. Quatro dos estudos foram conduzidos no Chile, três no Brasil, dois em Portugal, um na Tunísia, um na Tailândia, um nos Estados Unidos e um na Espanha. Os estudos utilizaram diferentes castas de uvas para a confecção das farinhas e as respectivas avaliações composicionais estão descritas em cada um dos trabalhos.

Estudos pré-clínicos

Charradi *et. al.* (2017) (8) relataram o potencial efeito anti lipotóxico de uma alta dosagem de farinha da semente e casca de uva (GSSF) no cérebro de ratos fêmeas ou machos obesos induzidos por uma dieta rica em gordura (HFD), com uma ênfase na proteção putativa contra o estresse oxidativo e inflamação induzidos por lipotoxicidade. A dieta dos animais foi misturada com 5% da GSSF por oito semanas. Ao final do período experimental, os autores puderam observar que essa suplementação resultou na proteção contra o aumento do acúmulo de LDL-colesterol no plasma e no cérebro, lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e diminuição da atividade antioxidante causada pela HFD. A GSSF também anulou os distúrbios causados pela HFD em metais de transição e enzimas associadas, mediadores intracelulares e enzimas

associadas, adipocinas periféricas e deposição de lipídios no cérebro. E, embora a HFD altere mais significativamente a lipotoxicidade cerebral em ratos machos do que fêmeas, sendo dependente do sexo, a menor probabilidade de as fêmeas desenvolverem doenças inflamatórias cerebrais relacionadas está relacionada ao papel anti-inflamatório dos estrogênios. No entanto, a suplementação com GSSF protegeu eficientemente ambos os sexos.

Um estudo experimental desenvolvido por Souza et al. (2019) (9) avaliou se a suplementação dietética com GPF foi capaz de prevenir ou reduzir o dano oxidativo hepático de carpas-capim (*Ctenopharyngodon idella*) infectadas experimentalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse sentido, os autores incluíram 150 e 300 mg/kg de GPF na dieta basal dos peixes. O experimento resultou no aumento do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático devido a um aumento significativo nas atividades hepáticas das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) e nos níveis hepáticos de capacidade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP), demonstrando uma alta capacidade de sequestrar o radical peróxil. Além disso, os níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROS), metabólitos do óxido nítrico (Nox) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos animais tratados permaneceram semelhantes aos dos grupos controle, já os não tratados apresentaram concentrações significativamente maiores desses marcadores, demonstrando que a suplementação profilática foi capaz de proteger o fígado contra danos oxidativos.

De acordo com a literatura, várias evidências têm demonstrado que os compostos bioativos da uva exercem efeitos hepatoprotetores, às vezes, por ação sinérgica. Ainda assim, o resveratrol, que é o principal componente da uva tinta, é considerado o principal responsável pelas ações antioxidantes que podem ser observadas nestas culturas (10). Entre os meios de ação do resveratrol estão a supressão da síntese de EROS pela inibição da depleção enzimática ou pela quelação de oligoelementos envolvidos na produção de radicais livres, eliminação de EROS e regulação ou proteção da defesa antioxidante e ativação de fatores da via de defesa (9).

Também em 2019, Alba et al. (11) realizaram um delineamento experimental para avaliar os efeitos da GPF na atividade antioxidante, variáveis bioquímicas, componentes do sistema imunológico e produção e qualidade do leite de ovelhas Lacaune sob estresse térmico. Os animais receberam 0,8 kg/dia de um composto concentrado por 1 ou 2% da GPF, dividido em duas administrações ao dia. Os autores puderam demonstrar que a suplementação concentrada resultou em uma resposta antioxidante elevada no soro das ovelhas. Além disso, os níveis séricos de uréia e glicose foram reduzidos enquanto as concentrações séricas de triglicérides foram maiores nos animais suplementados com 2% de GPF.

Este estudo pôde demonstrar que a administração experimental de GPF resultou no maior controle do estresse oxidativo, aumento da eficiência produtiva e melhora na saúde dos ovinos. Nesse sentido, pode-se observar que o aumento das concentrações séricas sustenta ainda mais a regulação positiva da capacidade antioxidante do leite após a administração da GPF, que está relacionada a antioxidantes, como quercetina, resveratrol e fenóis que constituem a composição química da uva. Além disso, os autores assumem que o aumento da eficiência produtiva após a inclusão da GPF pode ser resultado do maior controle do estresse oxidativo e diminuição da concentração de radicais livres. Além disso, há a hipótese de que, como a suplementação de GPF exerceu uma proteção contra a peroxidação lipídica do leite, poderia aumentar a vida útil do leite e seus derivados (11).

Recentemente, em 2021, Harikrishnan et al.(12) avaliaram os efeitos da inclusão dietética de GPF no crescimento, perfil antioxidante e anti-inflamatório, imunidade inata-adaptativa e expressão de genes imunes em *Labeo rohita* contra *Flavobacterium columnaris*. Os animais foram separados em quatro grupos diferentes que receberam 0, 100, 200 ou 300 mg/kg da GPF suplementada na dieta basal. Após o protocolo experimental de 60 dias, os autores puderam observar que a dieta de inclusão de 200 mg/kg de GPF exibiu os resultados mais significativos na taxa de crescimento, status antioxidante e mecanismos de defesa imunológica do que outras concentrações da farinha. Nesse sentido, houve um aumento significativo de malondialdeído (MDA), SOD, glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), atividade fagocitária (PC), explosão respiratória (RB), via alternativa do complemento (ACP), lisozima (Lyz), e imunoglobulina M total (IgM) nos grupos com maior concentração do suplemento de uva. De acordo com o presente trabalho, a GPF foi capaz de melhorar a via antioxidante enzimática e não enzimática através do aumento de enzimas acompanhado de um equilíbrio entre síntese e exclusão de EROs.

Em 2019, Rivera et al.(13) lideraram um estudo experimental para investigar o impacto de uma suplementação dietética de GPF em um modelo de cardiopatia isquêmica letal. Nesse sentido, machos e fêmeas SR-B1 KO/ApoER61^{h/h} receberam 20% de acréscimo de uma dieta aterogênica contendo alto teor de gordura, colesterol alto e ácido fólico à dieta basal, 20% de farinha de bagaço de vinho tinto (RWPF) na dieta experimental ou 10% de fibra de aveia acrescida à dieta aterogênica. Após o protocolo experimental, os autores puderam observar que a suplementação com RWPF apresentou melhora significativa na expectativa de vida dos animais em comparação aos grupos que não receberam a farinha. Ao analisar a capacidade antioxidante plasmática da RWGP, os autores puderam observar que ela diminuiu os níveis de oxidação de dihidrorodamina (DHR) para os valores basais, enquanto que a dieta experimental exerceu um aumento de mais de 100% neste parâmetro. Por fim, os autores avaliaram os distúrbios cardíacos causados pela administração de uma dieta aterogênica e os potenciais efeitos da suplementação de RWGP. Nesse sentido, o grupo alimentado com farinha apresentou menor formação de placas ateroscleróticas e áreas coradas com Oil Red O no final do experimento e uma restauração significativa da função cardíaca sistólica no dia 14 para níveis normais.

Os achados elucidados por Rivera et al. 2019 (13) mostraram que mais do que aumentar a vida útil dos camundongos, o consumo de RWGP foi associado a uma redução significativa nas lesões ateroscleróticas e na doença isquêmica do coração e exibiu um efeito antioxidante. Os resultados encontrados pelo presente artigo indicam que o efeito da RWGP em uma diversidade de alvos não está relacionado apenas à presença abundante de fibras, uma vez que o grupo alimentado com fibra de aveia não demonstrou os mesmos efeitos que o alimentado com farinha, mas foi provavelmente devido a componentes específicos da farinha RWGP.

Em 2015, Hernández-Salinas et al. (14) realizaram um estudo para investigar se a suplementação de bagaço de uva de vinho (WGP) pode prevenir os distúrbios causados por um modelo animal de síndrome metabólica induzido por dieta rica em frutose no metabolismo da glicose e estresse oxidativo de ratos. Nesse sentido, os animais foram alimentados com dieta controle, dieta controle mais 20% de WGP, dieta controle mais 50% de dieta rica em frutose ou 50% de dieta rica em frutose mais 20% de WGP. Os autores então mediram os níveis séricos de glicose, insulina e triglicerídeos, pressão arterial e peso corporal. Além disso, o índice de avaliação do modelo de homeostase (HOMA) foi calculado, o teste de tolerância à glicose foi realizado e o índice de estresse oxidativo foi medido no plasma e no rim. Ao final do protocolo experimental os autores puderam observar que a suplementação de WGP foi capaz de prevenir o

aumento dos níveis de TBARS no plasma e no tecido renal causado pela administração de uma dieta rica em frutose. Além disso, também preveniu o aumento do índice HOMA, glicemia de jejum e insulina plasmática quando comparado ao grupo intervenção não tratado. Estudos anteriores na literatura já mostraram que os polifenóis dietéticos podem atenuar a inflamação sistêmica através da modulação das atividades dos principais fatores de transcrição que regulam as respostas celulares ao estresse oxidativo e inflamação (15).

Estudos clínicos/observacionais em modelos humanos

Em 2015, Urquiaga et al. (16) projetaram um estudo prospectivo, randomizado e controlado de grupos paralelos para avaliar o efeito da farinha de bagaço de uva de vinho (WGPF) em componentes da síndrome metabólica (SM) em humanos. Nesse sentido, foram recrutados trabalhadores voluntários do sexo masculino que consumiam regularmente uma dieta onívora e apresentavam pelo menos um componente da SM. Após a seleção dos participantes do estudo, eles foram aleatoriamente designados para grupo intervenção ou controle. Ambos os grupos foram orientados a manter seus hábitos alimentares e hábitos de vida regulares, com exceção do grupo intervenção que também foi orientado a consumir 20 g de WGPF/dia durante as 16 semanas do estudo. A WGPF foi consumida em pão, biscoitos ou diluída em água. Os participantes passaram por avaliações clínicas, nutricionais, antropométricas e laboratoriais no início e no final do estudo. Nesse sentido, ao final do estudo, os autores puderam observar que o grupo controle apresentou aumento estatisticamente significativo no índice de massa corporal, enquanto não foram observadas diferenças significativas nas características antropométricas do grupo intervenção. O consumo de WGPF resultou em uma diminuição significativa da pressão arterial sistólica e diastólica, níveis de glicose em jejum e danos proteicos medidos através de grupos carbonila em proteínas plasmáticas, enquanto γ -tocoferol, δ -tocoferol e α -tocoferol aumentaram significativamente no grupo suplementado com WGPF.

Mais recentemente, em 2018, Urquiaga et al. (17) desenharam um ensaio longitudinal de três meses consistindo em dois períodos de tratamento de quatro semanas, separados por um terceiro período de limpeza de quatro semanas. Foram recrutados trabalhadores voluntários do sexo masculino que consumiam regularmente uma dieta onívora e apresentavam pelo menos um componente da SM e índice de massa corporal (IMC) entre 25,0 e 39,9 kg/m². Os participantes foram solicitados a manter seus hábitos alimentares e estilo de vida regulares durante o estudo, exceto pela ingestão diária de hambúrgueres contendo 7g de WGPF durante as primeiras e últimas quatro semanas do protocolo experimental. Os participantes tiveram avaliações clínicas, nutricionais e antropométricas no início e no final do estudo. Após as 16 semanas, os autores puderam observar que o consumo do hambúrguer WGPF resultou em uma diminuição significativa no valor da glicemia e do índice HOMA ao longo do período experimental e permaneceu baixo durante o período de limpeza. De acordo com a insulina plasmática, pode-se observar uma tendência de diminuição durante o período de consumo do WGPF-hambúrguer, que permaneceu baixa durante o período de limpeza. De acordo com os antioxidantes plasmáticos, o período de consumo dos hambúrgueres WGPF resultou em um aumento da concentração de vitamina C e diminuição dos níveis plasmáticos de ácido úrico e capacidade de eliminação de radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH·). Além disso, o consumo de hambúrgueres WGPF exerceu uma diminuição significativa sobre os níveis de produtos de proteína de oxidação avançada (AOPP) e lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL).

Em ambos os estudos, os autores puderam observar uma redução nos níveis de glicemia de jejum e, além do GPF ser rico em fibra dietética antioxidante, que é uma substância conhecida

que é resistente à digestão por enzimas gastrointestinais humanas, já existem evidências relacionando seu consumo a uma melhora no metabolismo dos carboidratos. Todavia, o mecanismo associado a esses efeitos benéficos ainda não é conhecido e se hipotetiza que a fibra alimentar atue em sinergismo com o conteúdo fenólico dos GPFs (17). Além disso, pode-se observar uma redução estatisticamente significativa da pressão arterial após a ingestão de WGPF. Dados anteriores da literatura associam o consumo de extratos de uva, ricos em ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas, estilbenos e lipídios, com efeitos anti-hipertensivos e, conseqüentemente, cardioprotetores (18). Além disso, produtos antioxidantes associados a fibras que são liberados pela fermentação colônica podem explicar a redução na pressão arterial observada após a suplementação de WGPF (16).

De acordo com os resultados observados por Urquiaga et al. 2015 e 2018 (16,17), o consumo de WGPF levou a um aumento das defesas antioxidantes e uma redução nos marcadores de danos oxidativos e proteicos, o que reforça a capacidade antioxidante das uvas conforme relatado anteriormente na literatura (18). Por fim, alguns dos participantes relataram efeitos colaterais durante o protocolo experimental quando foram orientados a consumir WGPF como aumento de gases intestinais, azia, regularização do trânsito intestinal, fezes mais moles, aumento do apetite, dispepsia e refluxo gastroesofágico (16). Embora o consumo de WGPF tenha demonstrado efeitos benéficos em indivíduos humanos conforme descrito nos estudos anteriores incluídos nesta revisão, os autores destacam que houveram algumas limitações nesses estudos, como: o baixo número de participantes que conseguiram terminar o protocolo, o viés que pode ter ocorrido devido ao escopo aberto dos protocolos, as diferenças de ingestão calórica e composição alimentar de cada participante que influenciam os resultados finais mencionados acima (16,17), o que reforça a necessidade de desenvolver novos estudos que envolvam um maior número de participantes e investigar diferentes características, como diabetes e doenças cardiovasculares no âmbito humano, a fim de compreender melhor os efeitos potenciais da suplementação de GPFs.

Aplicações da farinha de bagaço de uva na indústria alimentícia

Em 2020, Palma et al. (5) realizaram uma avaliação sensorial de biscoitos salgados fortificados com GPF nas porcentagens de 5 e 10%. Os participantes receberam cinco formulações diferentes de biscoitos: farinha da variedade Arinto (5 e 10% incorporada à farinha de trigo), farinha da variedade Touriga Nacional (5 e 10% incorporada à farinha de trigo) e a mesma formulação, sem GPFs, foi usada como controle. Os atributos avaliados pelos voluntários foram: cor, aroma, sabor, textura e impressão global por meio de uma escala hedônica de 5 pontos. Além disso, a intenção de compra também foi parametrizada de acordo com uma escala de 5 pontos e foi solicitado aos participantes que escolhessem de qual dos biscoitos “mais gostam” e de qual “menos gostam”.

Ao final da avaliação sensorial, os autores puderam observar que o biscoito Arinto 10% apresentou os maiores escores de cor, sabor, textura, apreciação global e intenção de compra quando comparado ao restante dos biscoitos, embora nenhum desses resultados seja estatisticamente significativo. Adicionalmente, pôde-se observar que as formulações com as menores concentrações de GPFs foram as menos apreciadas pelos participantes (Arinto 5% e Touriga 5%). Por fim, a questão de escolha das bolachas mais e menos apreciada resultou num maior número de votos para a Touriga Nacional 10% como a bolacha “mais apreciada” e a Touriga Nacional 5% como a “menos apreciada”.

Da mesma forma, em 2021, Palma et al. (19) teve como objetivo avaliar a aceitabilidade de biscoitos doces fortificados com farinhas de bagaço de Arinto ou Touriga Nacional, em maior concentração e com maior abrangência de voluntários do que o trabalho anterior. Os participantes receberam cinco biscoitos diferentemente formulados: farinha da variedade Arinto nas concentrações de 15 e 20%, farinha da variedade Touriga Nacional nas concentrações de 15 e 20% e biscoitos controle sem suplementação de GPFs. Os testes foram realizados em dois dias diferentes e os participantes receberam um questionário para opinar sobre cor, sabor, textura, aroma e impressão final geral, intenção de compra e preferência de biscoito doce no qual os participantes foram solicitados a classificar os biscoitos como “mais gostei”, “gostei mais ou menos” e “menos gostei”.

Neste momento, os autores puderam observar que quanto à cor, sabor e intenção de compra as maiores pontuações foram atribuídas ao biscoito controle. Enquanto isso, ambas as formulações de farinha de Touriga Nacional apresentaram a menor pontuação relacionada à cor e 15% de farinha de Touriga Nacional de sabor. Por outro lado, os biscoitos fortificados com 15% de farinha de Touriga Nacional apresentaram as maiores pontuações de textura e ambos os biscoitos fortificados com 20% tiveram a pontuação mais baixa de sabor. De acordo com a intenção de compra, os maiores percentuais foram atribuídos às incorporações do Arinto GPF de 15 e 20% e os biscoitos com menor intenção de compra foram os da formulação controle. Por fim, as preferências de escolha demonstraram que o biscoito mais apreciado foi o controle, e entre os biscoitos fortificados, as pontuações mais altas foram da Touriga Nacional 15 e 20% seguida do Arinto 20 e 15%.

Ortega-Heras et al. 2019 (20) elaborou um estudo para avaliar a adequação dos atributos sensoriais, propriedades nutricionais, de cor e textura de muffins fortificados com GPF vermelha e branca. Para isso, foram analisadas cinco formulações de muffins: um muffin controle composto por 100% de farinha de trigo integral e muffins elaborados com 10 e 20% de GPF branca ou vermelha (sem sementes). Para a análise sensorial, os participantes receberam um biscoito de cada formulação e foram solicitados a indicar o grau de preferência por meio de uma escala hedônica de nove pontos, variando de “desgostei extremamente” a “gostei extremamente”. Os atributos avaliados foram cor da superfície, cor do miolo, doçura, dureza, esponjosidade e sabor, utilizando uma escala bipolar de cinco pontos. Além disso, foram avaliadas a composição nutricional, aumento de altura e perda de peso, análise do perfil de cor e textura dos muffins, de acordo com cada metodologia proposta anteriormente. De acordo com a composição nutricional dos muffins, pode-se observar que os muffins fortificados com GPFs apresentaram maior teor de fibra e gordura quando comparados aos muffins controle, enquanto os muffins controle apresentaram o maior aumento de altura e os muffins fortificados 20% apresentaram os maiores escores de perda de peso. Em relação aos parâmetros de cor e textura, os muffins elaborados com GPFs foram mais escuros e firmes quando comparados ao muffin controle. Além disso, a adição de GPFs resultou em um aumento da mastigabilidade quando comparado aos muffins controle e uma diminuição da resiliência à medida que a concentração de GPFs aumentou. Por fim, as concentrações de 20% de GPFs sofreram uma redução significativa da elasticidade dos muffins.

Após a análise sensorial, os autores puderam observar que o muffin mais apreciado foi o controle, seguido da formulação a 10% de GPFs vermelha e branca. As análises organolépticas mostraram que os muffins reformulados tinham “muito mais” cor e sabor, principalmente na formulação com 20% de uva tinta. De acordo com a percepção de doçura, pode-se observar que as formulações de uva branca apresentaram os maiores escores de percepção “muito menos”.

Em 2014, Walker et al. (21) lideraram um estudo para avaliar os efeitos da fortificação de produtos de panificação com 5, 10 ou 15% de farinhas de uva Pinot Noir ou Pinot Grigio. Nesse sentido, as farinhas foram adicionadas ao pão, muffins e brownies, os produtos finais foram então avaliados quanto ao teor de fenólicos totais, atividade sequestrante de radicais, teor de fibra alimentar e propriedades físico-químicas e sensoriais. Para a avaliação sensorial, os participantes receberam 2 amostras de cada produto de panificação e avaliaram quanto a preferência por parâmetros estabelecidos em uma escala hedônica de 9 pontos. As análises das propriedades físico-químicas e dos compostos bioativos foram realizadas de acordo com a metodologia estabelecida para cada parâmetro.

Ao final do experimento os autores puderam observar que a suplementação com WGPF resultou em menor capacidade de retenção de água e maior capacidade de retenção de solvente de sacarose quando comparada à formulação controle, o que significa que WGP absorve menos água que a farinha de trigo e pode apresentar um pão menor tamanho da extensibilidade diminuída devido ao seu alto teor de fibra, respectivamente. De acordo com as propriedades físico-químicas dos itens de panificação, a amostra de 20% de bagaço de uva de vinho branco (WWGP) apresentou o maior teor de umidade, o que pode ser explicado pela maior concentração de açúcar no WWGP. Por outro lado, as amostras WWGP de 15 e 20% apresentaram menor atividade de água do que as demais formulações, o que provavelmente pode ser explicado, novamente, pela capacidade dos açúcares de reter a água disponível e diminuir o teor de água disponível para participar das reações químicas. De acordo com as amostras de brownie, o RWGP 25% apresentou um teor de umidade significativamente maior quando comparado à formulação controle, enquanto a atividade de água foi a menor para as amostras de 15 e 25% RWGP.

Em relação à cor, os produtos de panificação formulados com WGP tornaram-se mais escuros à medida que a porcentagem de farinha aumentava, sendo o RWGP uma coloração roxo escuro a vermelho e o WWGP uma coloração marrom amarelada que pôde ser observada nos produtos de panificação. Além disso, todos os muffins e pães fortificados com WGP apresentaram menor volume de pão e um aumento na mastigabilidade e firmeza quando comparados à formulação controle, enquanto os muffins controle apresentaram uma elasticidade significativamente maior do que todas as outras amostras fortificadas com WGP.

Em relação à composição bioativa, pode-se observar que o teor de fenólicos totais e a atividade sequestrante de radicais dos pães aumentaram à medida que o percentual de WGP aumentou. Para os muffins, o teor de fenólicos totais seguiu a mesma tendência que o aumento de WGP foi apresentado, exceto que as amostras WWGP apresentaram valores de eliminação de radicais significativamente menores quando comparadas às amostras RWGP. Da mesma forma, a atividade de eliminação de radicais de brownies só foi significativamente maior em amostras fortificadas com 10 e 25% de RWGP. Quanto ao teor de fibra alimentar, houve uma tendência de aumento à medida que o percentual de GPFs aumentou também.

Por fim, a aceitação do consumidor do produto de panificação fortificado por RWGP demonstrou que os pães de 5 e 10% apresentaram menor classificação para sensação na boca, o que sugere que essas amostras ficaram um pouco secas, como esperado após a atividade de água e retenção. Em relação às amostras de muffins, a formulação de 5% apresentou a cor mais aceitável, pois os 10% apresentaram escores significativamente maiores e o controle menor, indicando que essas amostras eram muito escuras e claras, respectivamente. Quanto à classificação de preferência pelo aroma, os muffins 5% RWGP apresentaram as maiores pontuações das amostras fortificadas, enquanto o mais apreciado foi o controle. Para os brownies,

a amostra menos apreciada para preferência de textura foi o 20% RWGP, que segundo os provadores, apresentou grande granulometria do bagaço, o que interferiu neste atributo.

Em 2019, Cilli et al. (22) lideraram um estudo com o objetivo de investigar o potencial antioxidante do GPF em um hambúrguer de salmão congelado. Nesse sentido, voluntários foram recrutados para participar de uma avaliação sensorial na qual receberam aproximadamente 10 g de três hambúrgueres diferentemente formulados: o controle negativo, e 1 ou 2% de suplementação de GPF em hambúrgueres de peixe que foram avaliados através de sua cor, odor, sabor, textura, aparência e qualidade geral, usando uma escala hedônica verbal de 9 pontos. Os participantes também foram convidados a dar sua opinião sobre a intenção de compra usando uma escala de 5 pontos. Os pesquisadores também analisaram o conteúdo de TBARS e a citotoxicidade *in vitro* do GPF por meio de metodologia previamente estabelecida. De acordo com a citotoxicidade, o GPF apresentou boa citocompatibilidade quando exposto a células de fibroblastos de camundongo, exercendo efeitos citotóxicos apenas a 800 mg de GPF/ml, o que significa que as formulações de 1 e 2% de hambúrgueres são seguras, pois representam 100 e 200 mg de GPF/ml, respectivamente. A composição centesimal dos hambúrgueres mostrou que a adição de GPF melhorou o teor de fibra alimentar e a escurecimento quando comparado à amostra controle. Quanto à avaliação sensorial dos hambúrgueres de salmão, os pesquisadores puderam observar que a suplementação de GPF foi menos apreciada pela aparência, cor e qualidade geral em comparação ao controle negativo. Em geral, a formulação de hambúrguer 1% GPF foi mais aceita pelos consumidores e apresentou maior intenção de compra quando comparada às amostras 2%. Por fim, os autores puderam observar que a suplementação de GPF em hambúrgueres resultou em diminuição do teor de TBARS durante o armazenamento sem comprometer negativamente as características nutricionais ou microbiológicas.

Com base nos resultados apresentados pelos estudos mencionados anteriormente, pode-se observar que diferentes concentrações de GPFs em diferentes produtos de panificação (salgados e doces) e hambúrguer demonstraram uma preferência heterogênea pelas amostras controle ou fortificadas e cada porcentagem da farinha. Em geral, a adição de GPFs interfere nas características organolépticas como a cor, em que o produto final tende a ser mais escuro à medida que a porcentagem de farinha aumenta e a apresentar uma característica semelhante à casta da uva, o que faz com que adquira uma coloração púrpura a cor vermelha quando fortificada com RWGP e uma cor amarela a marrom quando adicionadas as farinhas WWGP. A capacidade do GPF de influenciar na cor dos produtos representa um atributo benéfico, pois, segundo a literatura, os consumidores tendem a associar os produtos mais escuros aos mais saudáveis, sendo estes a escolha preferencial na busca por um alimento funcional (21). Além disso, o GPF apresentou maior teor de fibra alimentar quando comparado às formulações controle investigadas nos estudos citados anteriormente, se ampliando, também, conforme o percentual de GPF aumentou. De acordo com a literatura, a ingestão de fibras alimentares está associada à diminuição do risco de doenças cardiovasculares (23) e outras doenças crônicas, além de uma associação com menor peso corporal, o que representa benefícios para a saúde (24).

Além disso, as análises de composição química demonstraram que os GPFs são ricos em polifenóis e compostos bioativos, pois suas concentrações foram geralmente superiores às encontradas nas formulações controle. Quanto aos produtos finais, a composição fenólica tende a aumentar à medida que a porcentagem de GPF aumenta. Outra característica dos produtos de panificação fortificados é a dureza e a mastigabilidade, as quais os participantes indicaram que essas amostras apresentavam textura mais seca, o que pode ser explicado pela menor atividade de

água e retenção de água das farinhas, o que resulta em hidratação incompleta da farinha e pode atribuir sua textura mais dura (21).

Por fim, os autores puderam observar que algumas vezes, no entanto, um produto de panificação fortificado apresentou pontuações mais baixas do que as amostras controle ao analisar características isoladas como cor e textura, as mesmas amostras poderiam atingir valores mais altos de intenção de compra ou preferência. De acordo com a literatura, poderia ser explicado pelo fato de os consumidores nem sempre responderem às questões “gostei e desgostei” da mesma forma que as específicas devido à influência emocional (5,19). Nesse sentido, enfatiza-se a necessidade de avaliar a mesma formulação com métodos diferentes e a demanda por novos estudos investigando diferentes concentrações e preparações utilizando GPF e uma maior abrangência dos voluntários para melhor compreender as preferências gerais para a introdução do seu consumo como alimento funcional.

Conclusão

GPF é uma importante fonte de compostos bioativos com atividades promotoras de saúde como antioxidante, cardioprotetora e anti-hiperglicêmica. Evidências recentes estão demonstrando que esse subproduto pode ter um efeito importante na otimização dos benefícios à saúde e na minimização de possíveis marcadores negativos de saúde. Além disso, a incorporação de GPF, rica em fibras, em diferentes receitas resulta em maior valor nutricional e propriedades sensoriais do produto final. Embora existam estudos pré-clínicos e clínicos observando que alguns mecanismos desempenhados por sua composição química podem atuar como cardio e neuroprotetores, mais investigações sobre os alvos e vias pelas quais os efeitos da GPF podem atuar para melhorar a saúde e a qualidade nutricional dos alimentos são necessários para entender melhor sua interação molecular em parâmetros bioquímicos sistêmicos, vida de prateleira e características sensoriais de alimentos.

Declaração sobre as contribuições do autor:

RCP - desenho do estudo, análise de dados, redação

PP - supervisão, revisão

MN- supervisão, revisão

MLP - supervisão, revisão

RGT - desenho do estudo, supervisão, revisão final

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há relação financeira ou pessoal que possa apresentar um potencial conflito de interesses.

GRAPE POMACE FLOUR METABOLIC EFFECTS: A REVIEW OF PRE-CLINICAL AND CLINICAL BIOLOGICAL TRIALS

Raphaela Cassol Piccoli¹, Paula Pereira^{2,3,4}, Marisa Nicolai², Maria Lúcia Palma², Francieli Moro Stefanello⁵,

Rejane Giacomelli Tavares^{2,5*}

¹ Postgraduation Program in Food and Nutrition, College of Nutrition, Federal University of Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brazil.

² Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

³ Center for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal;

⁴ EPCV-ULHT-Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

⁵ Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Science (CCQFA), Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil.

* Corresponding author: Rejane Giacomelli Tavares, Federal University of Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, CEP: 96160-000.

Fone: 55 53 32757354 Ramal: 7354.

E-mail: tavares.rejane@gmail.com

Tables

Table 1. Detailed description of each preclinical study included in this review. (n=6)

Identification	Location	Sample	Duration in weeks	Intervention	Control	Main results
Charradi et al., 2017	Tunisia	18 male and female obese-induced Wistar rats	8 weeks	The animals were fed with a HFD or HFD + GSSF (5%)	The animals were fed with a standard diet	GSSF prevented superoxide anion and hydroxyl radical increase through high fat diet effect, abrogates LDL-accumulation on brain and plasma of male rats, corrected lipoperoxidation, protein carbonylation and NPSH decrease in male till control levels. The flour administration also abrogates the decrease on GPx and SOD activity. also abrogates the disturbances caused by the HFD in transition metals and associated enzymes, intracellular mediators and associated enzymes, peripheral adipokines and lipid brain deposition
Souza et al., 2019	Brazil	Juvenile grass carps were divided into six groups (A-F, n = 6 per group, in triplicate. Groups D to F were experimentally infected via intramuscular route with 100µL of <i>P. aeruginosa</i> strain	10 weeks	Groups B and E received a diet containing 150 mg of GPF/kg of feed, while groups C and F received a diet containing 300 mg of GPF/kg of feed, twice a day	Groups A and D received the basal diet (without GPF supplementation),	300 mg/kg GPF supplementation prevented the increase in hepatic ROS, NOx, and TBARS levels, and reduced the increase in hepatic SOD activity and prevented the increase in CAT activity. Also, the 300 mg/kg GPF supplementation prevented the increase in hepatic ACAP levels observed in infected fish Sheep in the GRF treatment groups were more efficient in milk production than the control ones. Protein and fat on milk concentration were greater in the 2% GRF at the 15 th day of experiment. The somatic cell count was decreased in sheep on GRF diets. Lipid peroxidation concentrations were reduced in milk and serum of the GRF groups, while total antioxidant capacity was greater. The flour did also stimulate antioxidant enzymes activity and serum markers such as glucose and triglycerides were greater on the 2% GRF group. Total protein and globulin concentrations were decreased on the 2% GRF
Alba et al., 2019	Brazil	Twenty-seven multiparous lactating sheep	2 weeks	Supply of 1% or 2% of GRF in the concentrate. Each animal received 0.8 kg/d of concentrate, divided into 2 daily feeding	Control concentrates without GRF	

Harikrishnan et al., 2021	Thailand	600 healthy rohu, <i>L. rohita</i> fish infected or not with <i>Flavobacterium columnaris</i>	8 weeks	Fishes were fed with 100, 200 or 300 mg/kg ⁻¹ of GPF diets, twice a day, and received or not a administration of <i>Flavobacterium columnaris</i>	Animals were fed with normal fish basal diet without GPF. The positive and negative controls were injected with 50µl of phosphate buffer saline or 50µl of <i>F. columnaris</i> intramuscularly (i.m.) at 1.2 × 10 ⁻⁷ CFU ml ⁻¹ , respectively	Challenged or unchallenged 200 and 300 mg GPF diets resulted in significantly incensement on MDA, GST, SOD, GPx RB and ACP, IgM activity. The Lyz, β-2M, CC3 and IgM expression were higher on 200 and 300mg treated groups. The mRNA transcripts level of SOD was significantly higher in the unchallenged fish fed with 200 mg diet when compared with challenged ones fed with the same diet. The GPx mRNA transcripts were higher in the normal fish treated with 200 mg diet as compared with other groups fed with 200 or 300 mg GPF diets. Nrf2 and NKEF-β were also significantly higher in both groups fed with 200 and 300 mg GPF diets. Expressions of TLR22 and hepcidin mRNA increased significantly in the unchallenged and challenged fish fed with 200 and 300 mg GPF diets
Rivera et al., 2019	Chile	60 SR-B1 KO/ApoER61 ^{h/h} male and female mice submitted to a diet-induced model of occlusive atherosclerosis by the administration of a HFC-atherogenic diet	1 or 2 weeks	A high fat diet was supplemented with 20% of red wine pomace flour or 10% chow/10% oat fibre	Animals were fed with the high fat diet supplemented with 20% of chow	RWGP supplementation showed a significant improvement on mice lifespan, prevented the increase of TNF-α and IL-10 levels and enlarged spleens after 7 days of administration. Additionally, the decrease in plasma antioxidant activity induced by the atherogenic diet was fully prevented by dietary supplementation of RWGP for 14 days as shown by a significant decrease of DHR oxidation to baseline levels. Moreover, after 14 days, it could be observed a reduction on the formation of atherosclerotic plaques on the aortic arch and its branches on RWGP supplemented mice compared to the HFC-control group. Finally, could be observed a significant restoration of systolic heart function at day 14 to normal levels on RWGP-fed mice compared with HFC-Control
Hernandez-Salinas et al., 2015	Chile	29 male Sprague-Dawley rats submitted to a diet-induced model of metabolic syndrome beyond the administration of a high fructose diet	16 weeks	Control plus 20 % of wine grape pomace flour, 50% fructose plus 20 % of wine GPF	Animals received the control diet or high fructose diet (without the addition of GPF)	WGP reduced the increase in glucose, triglycerides and insulin levels in plasma observed after the administration of high fructose diet. Additionally, WGP supplementation prevented the increase of the area under curve of the glucose tolerance test, insulin concentration and HOMA-IR index caused by the experimental diet. Also, WGP prevented the increase of TBARS levels on plasma and kidneys and the decrease of mSOD levels on the kidney.

GPF: grape pomace flour ; GRF: grape residue flour; GSSF: grape seed and skin flour; WGP: wine grape pomace; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; LDL: low density lipoprotein; ROS: reactive oxygen species; NOx: nitric oxide; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; mRNA: micro MDA: malondialdehyde; RB: respiratory burst; ACP: alternative pathway complement; IgM: total immunoglobulin M; Lyz: lysozyme; TLR22: toll-like receptor-22; CC3: Complement C3; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NKEF- β : natural killer-cell enhancing factor β ; housekeeping gene (β -actin); HFC: high fat, high cholesterol, and cholic acid-containing

Table 2. Detailed description of each observational study included in this review. (n=2)

Identification	Location	Sample	Age	Duration in weeks	Intervention	Control	Main results
Urquiaga et al., 2015	Chile	38 male volunteer workers who regularly consumed an omnivorous diet having at least one of the five components of metabolic syndrome	From 30 to 65 years	16 weeks	20 g of WGPF consumed in bread, biscuits or as flour mixed with water during lunch, daily	Maintained their regular eating habits and lifestyles during the 16-weeks period	The daily 20g consumption of WGPF decreased systolic, diastolic and high blood pressure and fasting glucose levels significantly. Overall, WGPF significantly reduced the average number of metabolic syndrome components present per subject from 1.84 ± 1.62 /participant to 1.48 ± 1.29 /participant. Vitamin C, γ -tocopherol and α -tocopherol increased significantly after the WGPF consumption, while DPPH levels decreased from the baseline to the end of the study. Protein damage measured as carbonyl groups in plasma proteins decreased significantly in WGPF group by the end of the study.
Urquiaga et al., 2018	Chile	27 male volunteer workers who regularly consumed an omnivorous diet, each with at least one component of metabolic syndrome and a body mass index between 25.0 and 39.9 kg/m ² .	From 25 to 65 years	Two treatment periods of 4 weeks, separated by a third four-week wash-out period	1 burger of 100g formulated with 7% of WGPF prepared from a cabernet sauvignon winemaking byproduct, daily	Identical beef burgers (100g) made with the same raw beef, daily during the washing period	The glycemia and HOMA index decreased significantly during the experimental period and remained low throughout the washout period. During the period of WGPF consumption, vitamin C plasma levels increased significantly, and uric acid, DPPH and AOPP concentration were decreased. The oxLDL levels diminished significantly after the WGPF during the course of the experiment, even after the control-burger period

AOPP: advanced oxidation protein products; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; oxLDL: oxidized low-density lipoprotein; WGPF: wine grape pomace flour

Table 3. Detailed description of each sensorial study included in this review. (n=5)

Identification	Location	Sample	Age	Study design	Intervention	Main results
Palma et al., 2020	Portugal	53 untrained individuals (male and female), mainly students and researchers who voluntarily agreed to participate on this test	From 14 to 83 years	Sensory evaluation by applying a hedonic test	Participants received four different formulations with the incorporation of grape pomace flour to evaluate: cracker with 5% or 10% incorporation of Arinto variety flour and cracker with 5% or 10% incorporation of Touriga variety flour	The most appreciated crackers by the sensory evaluation characteristics were 10% Arinto, with the higher scores of colour, aroma, flavor and texture. The second most appreciated cracker were 10% Touriga. The “least liked” cracker was the 5% Touriga and the “most liked” were 10% Touriga
Palma et al., 2021	Portugal	149 untrained individuals of both sexes randomly recruited at the university campus on the testing days	From 18 to 88 years	Sensory test	Participants received five different formulations of sweet cookies with the incorporation of GPF to evaluate: cracker with 15% and 20% incorporation of Arinto or Touriga variety flour and a control preparation	Regarding color, the lowest scores were obtained for the two different incorporations of Touriga variety flour, and the lowest flavor score was obtained for the 15% Touriga incorporation cookie. Both 20% of GPF formulation cooked were described as the least favorite flavor. The 15% Touriga incorporation cookie was the most accepted texture
Ortega-Heras et al., 2019	Spain	104 untrained judges, habitual consumers (who consumes muffins at least once every week)	From 18 to 55 years	Sensory evaluations	Participants received five different formulations of muffins: a control muffin with 100% of whole-wheat flour, and muffins with 10 and 20% of, white or red GPF, replacing the part corresponding to whole-wheat flour with the product	All muffins prepared with grape by-products presented higher content of fibre and fat than the control one. Also, the muffins elaborated with the grape pomace products were darker than the control muffins, showing lower lightness values, both in the crust and in the crumb. the muffins with 10% of WP or RP had higher liking scores than those with 20% incorporation
Walker et al., 2014	United States	Graduate students and staff in the Department of Food Science & Technology	From 18 to 30 years	Sensory evaluation, physicochemical, bioactive, and sensory properties	For the sensory evaluation, the participants received 2 samples of RWGP and WWGP substituted wheat flour at concentration of 5%, 10%, and 15% for bread, 10%, 15%, 20%, and 25% RWGP for	According to the total phenolic content, the radical scavenging activity and the dietary fibre content the highest values were observed in 15% fortified samples with RWGP of baked breads and muffins. For the brownies, the highest levels of radical scavenging activity were observed on 10% RWGP fortified brownies and the dietary fibre on the 25% fortified ones.

					<p>brownies, and 5%, 10%, and 15% RWGP or 10%, 15%, and 20% WWGP for muffins. Physicochemical properties and bioactive compounds analyses were performed according to the literature to each parameter</p>	<p>Sensory evaluation concluded that there is no difference in overall liking of 5% and 10% RWGP breads and muffins or 15% and 20% WGP brownies compared to the controls</p>	
Cilli et al., 2019	Brazil	110 individuals recruited from the staff at the Federal University of São Paulo	untrained	From 18 to 56 years	<p>Sensory evaluation, microbiological properties, <i>in vitro</i> cytotoxicity and characterization of GPF</p>	<p>Participants received approximately 10g of three different formulations of salmon burger: a control negative and the addition of 1 or 2% of GPF. Microbiological properties, <i>in vitro</i> cytotoxicity and characterization of GPF were performed according to each methodology</p>	<p>Fortified burgers presented higher dietary fibre content when compared to the control samples. In addition, GPF demonstrated to be secure for human consumption as it only presented cytotoxic effects on mouse fibroblasts at 800 mg/ml, whereas the formulation of the burgers presented 100 or 200 mg/ml of GPF. According to the sensory evaluation, the 1% GPF formulated salmon burger has the highest acceptability when compared to the 2% samples, but both has lower scores when compared to the control burgers. According to the TBARS content on burgers, the researchers found out that the GPF exerted a decrease of it after frozen storage.</p>

RWGP: Pinot Noir wine grape pomace; WWGP: Pinot Grigio wine grape pomace

1 **EFEITOS METABÓLICOS DA FARINHA DO BAGAÇO DE UVA: UMA REVISÃO DE ENSAIOS**
2 **BIOLÓGICOS PRÉ CLÍNICOS E CLÍNICOS**

3
4
5 **Raphaela Cassol Piccoli¹, Paula Pereira^{2,3,4}, Marisa Nicolai², Maria Lídia Palma², Francieli Moro**
6 **Stefanello⁵, Rejane Giacomelli Tavares^{2,5*}**

7
8 ¹ Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de
9 Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brasil.

10 ² Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de
11 Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

12 ³ Center for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade
13 de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal;

14 ⁴ EPCV-ULHT-Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

15 ⁵ Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas,
16 Campus Universitário S/N, 96010-000, Pelotas-RS, Brasil.

17
18
19
20 *Autor correspondente: Rejane Giacomelli Tavares, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n,
21 Capão do Leão, RS, Brazil, CEP: 96160-000. Fone: 55 53 32757354 Ramal: 7354.
22 E-mail: tavares.rejane@gmail.com.

23

Tabelas

Tabela 1. Descrição detalhada de cada estudo pré-clínico incluído nesta revisão. (n=6)

Identificação	Localização	Amostra	Duração em semanas	Intervenção	Controle	Resultados principais
Charradi et al., 2017	Tunisia	18 ratos Wistar machos e fêmeas induzidos a obesidade	8 semanas	Os animais foram alimentados com HFD ou HFD + GSSF (5%)	Os animais foram alimentados com uma dieta padrão	O GSSF preveniu o aumento do ânion superóxido e do radical hidroxila através do efeito da dieta hiperlipídica, anulou o acúmulo de LDL no cérebro e plasma de ratos machos, corrigiu a lipoperoxidação, a carbonilação de proteínas e a diminuição do NPSH nos machos até os níveis de controle. A administração de farinha também anulou a diminuição da atividade de GPx e SOD, os distúrbios causados pela HFD em metais de transição e enzimas associadas, mediadores intracelulares e enzimas associadas, adipocinas periféricas e deposição cerebral de lipídios
Souza et al., 2019	Brasil	As carpas juvenis foram divididas em seis grupos (A-F, n = 6 por grupo, em triplicata). Os grupos D a F foram infectados experimentalmente por via intramuscular com 100 µL de cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 semanas	Os grupos B e E receberam dieta contendo 150 mg de GPF/kg de ração, enquanto os grupos C e F receberam dieta contendo 300 mg de GPF/kg de ração, duas vezes ao dia	Os grupos A e D receberam a dieta basal (sem suplementação de GPF),	A suplementação de 300 mg/kg de GPF preveniu o aumento dos níveis hepáticos de ROS, NOx e TBARS, e reduziu o aumento da atividade hepática de SOD e preveniu o aumento da atividade de CAT. Além disso, a suplementação de 300 mg/kg de GPF evitou o aumento dos níveis hepáticos de ACAP observados em peixes infectados As ovelhas dos grupos de tratamento GRF foram mais eficientes na produção de leite do que as controle. A concentração de proteína e gordura no leite foi maior no GRF 2% no 15º dia de experimento. A contagem de células somáticas foi diminuída em ovelhas em dietas GRF. As concentrações de peroxidação lipídica foram reduzidas no leite e soro dos grupos GRF, enquanto a capacidade antioxidante total foi maior. A farinha também estimulou a atividade de enzimas antioxidantes e marcadores séricos como glicose e triglicerídeos, sendo maiores no grupo GRF 2%. As
Alba et al., 2019	Brasil	Vinte e sete ovelhas multíparas em lactação	2 semanas	Fornecimento de 1% ou 2% de GRF no concentrado. Cada animal recebeu 0,8 kg/d de concentrado, dividido em 2 alimentações diárias	Concentrados sem GRF	

Harikrishnan et al., 2021	Tailândia	600 peixes rohu, <i>L. rohita</i> saudáveis, infectados ou não com <i>Flavobacterium columnaris</i>	8 semanas	Os peixes foram alimentados com dietas suplementadas por 100, 200 ou 300 mg/kg ⁻¹ de GPF, duas vezes ao dia, e receberam ou não administração de <i>F. columnaris</i>	Os animais foram alimentados com dieta basal de peixe normal sem GPF. Os controles positivo e negativo foram injetados com 50µl de solução salina tampão fosfato ou 50µl de <i>F. columnaris</i> por via intramuscular a 1,2 ×10 ⁻⁷ UFC/ml ⁻¹ , respectivamente	concentrações de proteína total e globulina foram diminuídas no GRF 2% Dietas suplementadas por 200 e 300 mg de GPF desafiadas ou não desafiadas pela infecção bacteriana experimental resultaram em aumento significativo na atividade de MDA, GST, SOD, GPx RB e ACP, IgM. A expressão de Lyz, β -2M, CC3 e IgM foi maior nos grupos tratados com 200 e 300mg. O nível de transcritos de mRNA de SOD foi significativamente maior nos peixes não desafiados alimentados com 200 mg de GPF quando comparados com os desafiados alimentados com a mesma dieta. Os transcritos de mRNA de GPx foram maiores nos peixes normais tratados com dieta de 200 mg em comparação com outros grupos alimentados com dietas de 200 ou 300 mg de GPF. Nrf2 e NKEF- β também foram significativamente maiores em ambos os grupos alimentados com dietas de 200 e 300 mg de GPF. Expressões de mRNA de TLR22 e hepcidina aumentaram significativamente nos peixes não desafiados e desafiados alimentados com dietas de 200 e 300 mg de GPF.
Rivera et al., 2019	Chile	60 camundongos machos e fêmeas submetidos a um modelo de aterosclerose oclusiva induzida por dieta pela administração de uma dieta aterogênica HFC	1 ou 2 semanas	Uma dieta rica em gordura foi suplementada com 20% de farinha de bagaço de vinho tinto ou 10% de ração/10% de fibra de aveia	Os animais foram alimentados com a dieta hiperlipídica suplementada com 20% de ração	A suplementação de RWGP mostrou uma melhora significativa na expectativa de vida dos camundongos, preveniu o aumento dos níveis de TNF-α e IL-10 e aumentou os baços após 7 dias de administração. Além disso, a diminuição da atividade antioxidante do plasma induzida pela dieta aterogênica foi totalmente prevenida pela suplementação dietética de RWGP por 14 dias, como mostrado por uma diminuição significativa da oxidação de DHR para os níveis basais. Além disso, após 14 dias, pode-se observar uma redução na formação de placas ateroscleróticas no arco aórtico e suas ramificações nos camundongos suplementados com RWGP em comparação ao grupo HFC-controle. Finalmente, pode ser observada uma restauração significativa da função cardíaca sistólica no dia 14 para níveis normais em camundongos alimentados com RWGP em comparação com HFC-Control

Hernandez-Salinas et al., 2015	Chile	29 ratos Sprague-Dawley machos submetidos a um modelo de síndrome metabólica induzido pela administração de uma dieta rica em frutose	16 semanas	Controle mais 20% de WGP, 50% de frutose mais 20% de WGP	Os animais receberam a dieta controle ou dieta rica em frutose (sem adição de WGP)	WGP reduziu o aumento dos níveis de glicose, triglicérides e insulina no plasma observado após a administração de dieta rica em frutose. Além disso, a suplementação de WGP evitou o aumento da área sob a curva do teste de tolerância à glicose, concentração de insulina e índice HOMA-IR causados pela dieta experimental. Por fim o WGP preveniu o aumento dos níveis de TBARS no plasma e nos rins e a diminuição dos níveis de mSOD no rim.
--------------------------------	-------	---	------------	--	--	--

GPF: farinha de bagaço de uva; GRF: farinha de bagaço de uva; GSSF: farinha de semente e casca de uva; WGP: bagaço de uva para vinho; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; LDL: lipoproteína de baixa densidade; ROS: espécies reativas de oxigênio; NOx: óxido nítrico; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; mRNA: microMDA: malondialdeído; RB: explosão respiratória; ACP: complemento de via alternativa; IgM: imunoglobulina M total; Lyz: lisozima; TLR22: receptor-22 tipo toll; CC3: Complemento C3; Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; NKEF - β : fator β de aumento de células assassinas naturais ; gene de manutenção (β -actina); HFC: alto teor de gordura, colesterol alto e ácido cólico

Tabela 2. Descrição detalhada de cada estudo observacional incluído nesta revisão. (n=2)

Identificação	Localização	Amostra	Idade	Duração em semanas	Intervenção	Controle	Resultados principais
Urquiaga et al., 2015	Chile	38 trabalhadores voluntários do sexo masculino que consumiam regularmente uma dieta onívora com pelo menos um dos cinco componentes da síndrome metabólica	De 30 a 65 anos	16 semanas	20g de WGPF consumida no pão, biscoitos ou misturada com água durante o almoço, diariamente	Manteve seus hábitos alimentares e estilos de vida regulares durante o período de 16 semanas	O consumo diário de 20g de WGPF diminuiu significativamente a pressão arterial sistólica e diastólica altas e os níveis de glicemia de jejum. No geral, a WGPF reduziu significativamente o número médio de componentes da síndrome metabólica presentes por indivíduo de $1,84 \pm 1,62$ /participante para $1,48 \pm 1,29$ /participante. Vitamina C, γ -tocoferol e α -tocoferol aumentaram significativamente após o consumo de WGPF, enquanto os níveis de DPPH diminuíram desde o começo até o final do estudo. O dano proteico medido como grupos carbonila nas proteínas plasmáticas diminuiu significativamente no grupo WGPF ao o final do estudo.
Urquiaga et al., 2018	Chile	27 trabalhadores voluntários do sexo masculino que consumiam regularmente uma dieta onívora, cada um com pelo menos um componente da síndrome metabólica e índice de massa corporal entre 25,0 e 39,9 kg/m ² .	De 25 a 65 anos	Dois períodos de tratamento de 4 semanas, separados por um terceiro período de limpeza de quatro semanas	1 hambúrguer de 100g formulado com 7% de WGPF elaborado a partir de um subproduto da vinificação de cabernet sauvignon, diariamente	Hambúrgueres de carne idênticos (100g) feitos com a mesma carne crua, diariamente durante o período de limpeza	A glicemia e o índice HOMA diminuíram significativamente durante o período experimental e permaneceram baixos durante todo o período de limpeza. Durante o período de consumo de WGPF, os níveis plasmáticos de vitamina C aumentaram significativamente e as concentrações de ácido úrico, DPPH e AOPP diminuíram. Os níveis de oxLDL diminuíram significativamente após o consumo de WGPF durante o experimento, mesmo após o período de consumo do hambúrguer controle

AOPP: produtos de proteína de oxidação avançada; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; oxLDL : lipoproteína de baixa densidade oxidada; WGPF: farinha de bagaço de uva para vinho

Tabela 3. Descrição detalhada de cada estudo sensorial incluído nesta revisão. (n=5)

Identificação	Localização	Amostra	Idade	Design de estudo	Intervenção	Resultados principais
Palma et al., 2020	Portugal	53 indivíduos não treinados (homens e mulheres), principalmente estudantes e pesquisadores que concordaram voluntariamente em participar deste teste	De 14 a 83 anos	Avaliação sensorial através da aplicação de um teste hedônico	Os participantes receberam quatro formulações diferentes com incorporação GPF para avaliar: bolacha com 5% ou 10% de incorporação de farinha da variedade Arinto e bolacha com 5% ou 10% de incorporação de farinha da variedade Touriga	As bolachas mais apreciadas pelas características de avaliação sensorial foram 10% Arinto, com as maiores pontuações de cor, aroma, sabor e textura. A segunda bolacha mais apreciada foi a Touriga 10%. A bolacha “menos apreciada” foi a Touriga 5% e a “mais apreciada” foi a Touriga 10%
Palma et al., 2021	Portugal	149 indivíduos não treinados de ambos os sexos recrutados aleatoriamente no campus universitário nos dias de teste	De 18 a 88 anos	Avaliação sensorial através da aplicação de um teste hedônico	Os participantes receberam cinco formulações diferentes de biscoitos doces com incorporação de GPF para avaliar: biscoito com 15% e 20% de incorporação de farinha das variedades Arinto ou Touriga e uma preparação de controle	Em relação à cor, as menores notas foram obtidas pelas duas diferentes incorporações de farinha da variedade Touriga, e a menor nota de sabor foi obtida para o biscoito com 15% de incorporação de Touriga. Ambos as formulações com 20% de GPF foram descritos como o sabor menos preferido. O biscoito com 15% de incorporação de Touriga foi a textura mais aceita
Ortega-Heras et al., 2019	Espanha	104 juízes não treinados, consumidores habituais de muffins (pelo menos uma vez por semana)	De 18 a 55 anos	Avaliações sensoriais	Os participantes receberam cinco formulações diferentes de muffins: muffin controle com 100% de farinha de trigo integral e muffins com 10 e 20% de GPF branca ou vermelha, substituindo a parte correspondente à farinha de trigo integral pelo produto	Todos os muffins elaborados com subprodutos de uva apresentaram maior teor de fibra e gordura do que o controle. Além disso, os muffins elaborados com os produtos de bagaço de uva foram mais escuros que os muffins controle, apresentando menores valores de luminosidade, tanto na crosta quanto no miolo. Os muffins com 10% de GPF branca ou tinta tiveram pontuações de preferência mais altas do que aqueles com 20% de incorporação
Walker et al., 2014	Estados Unidos	Alunos de graduação e funcionários do Departamento de	De 18 a 30 anos	Avaliação sensorial, propriedades	Para a avaliação sensorial, os participantes receberam 2 amostras substituindo a farinha	De acordo com o teor de fenólicos totais, a atividade sequestrante de radicais e o teor de fibra alimentar, os maiores valores foram observados nas amostras

		Ciência e Tecnologia de Alimentos	físico-químicas, bioativas e sensoriais	de trigo por RWGP ou WWGP na concentração de 5%, 10% e 15% para pão, 10%, 15%, 20% e 25% RWGP para brownies e 5%, 10% e 15% RWGP ou 10%, 15% e 20% WWGP para muffins. As análises das propriedades físico-químicas e dos compostos bioativos foram realizadas de acordo com a literatura para cada parâmetro	fortificadas com 15% com RWGP de pães e muffins. Para os brownies, os maiores níveis de atividade de eliminação de radicais foram observados nos brownies fortificados com 10% RWGP e a fibra alimentar nos fortificados com 25%. A avaliação sensorial concluiu que não há diferença na preferência geral de pães e muffins 5% e 10% RWGP ou brownies 15% e 20% WGP em comparação com os controles
Cilli et al., 2019	Brasil	110 indivíduos não treinados recrutados no quadro de funcionários da Universidade Federal de São Paulo	De 18 a 56 anos Avaliação sensorial, propriedades microbiológicas, citotoxicidade <i>in vitro</i> e caracterização de GPF	Os participantes receberam aproximadamente 10g de três diferentes formulações de hambúrguer de salmão: um controle negativo e a adição de 1 ou 2% de GPF. As propriedades microbiológicas, citotoxicidade <i>in vitro</i> e caracterização do GPF foram realizadas de acordo com cada metodologia	Os hambúrgueres fortificados apresentaram maior teor de fibra alimentar quando comparados às amostras controle. Além disso, o GPF mostrou-se seguro para consumo humano, pois apresentou efeitos citotóxicos em fibroblastos de camundongos apenas a 800 mg/ml, enquanto a formulação dos hambúrgueres apresentou 100 ou 200 mg/ml de GPF. De acordo com a avaliação sensorial, o hambúrguer de salmão formulado com 1% GPF tem a maior aceitabilidade quando comparado às amostras de 2%, mas ambos apresentam pontuações inferiores quando comparados aos hambúrgueres controle. De acordo com o teor de TBARS nos hambúrgueres, os pesquisadores descobriram que o GPF exerceu uma diminuição dele após o armazenamento congelado.

RWGP: Bagaço de uva para vinho Pinot Noir; WWGP: Bagaço de uva de vinho Pinot Grigio

Anexo 3 - Manuscrito

Sustainable Intervention: Grape Pomace Flour ameliorates fasting glucose and mitigates streptozotocin-induced pancreatic damage in a Type 2 Diabetes animal model.

Submetido à revista *Biomarkers*

Sustainable Intervention: Grape Pomace Flour ameliorates fasting glucose and mitigates streptozotocin-induced pancreatic damage in a Type 2 Diabetes animal model.

Raphaela Cassol Piccoli^a, William Sanabria Simões^b, Solange Vega Custódio^b, Kelen Cristiane Machado Goularte^b, Karina Pereira Ludovico^b, Julia Eisenhardt de Mello^b, Ana Carolina Teixeira^b, Alethéa Gatto Barschak^c, Bruna Ferrary Diniz^d, Paula Pereira^{e,f,g}, Marisa Nicolai^e, Maria Lídia Palma^e, Roselia Maria Spanevello^h, Francieli Moro Stefanello^h, Rejane Giacomelli Tavares^{a,e,h*}

^aPostgraduation Program in Food and Nutrition, College of Nutrition, Federal University of Pelotas, 96010-610, Pelotas-RS, Brazil;

^bPostgraduation Program in Biochemistry and Bioprospection, Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil;

^cClinical Analysis Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

^dDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, 96900-010 Pelotas, Brazil.

^eCenter for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona, 1749-024 Lisboa, Portugal;

^fCenter for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal;

^gEPCV-ULHT-Universidade Lusófona 1749-024 Lisboa, Portugal;

^hCenter for Chemical, Pharmaceutical and Food Science (CCQFA), Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil.

*Corresponding author: Rejane Giacomelli Tavares, Federal University of Pelotas, Campus Universitário S/N, 96160-000, Pelotas-RS, Brazil.

Phone: +55 53 32757355

Fax: +55 53 32757354

Email: tavares.rejane@gmail.com

Abstract:

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is characterized by hyperglycemia, increasing the risk of cardiovascular diseases and oxidative imbalances. This study investigated the impact of 'Arinto' GPF (WGPF) and 'Touriga Nacional' GPF (RGPF) dietary supplementation in animal model of T2DM induced through high-fat diet (HFD) plus moderate streptozotocin (STZ) dose. Their effects on anthropometric, biochemical, oxidative, and histological parameters were assessed. Experimental T2DM induction resulted in metabolic disturbances, evident in the oral glucose tolerance test (OGTT), area under the curve, and serum glucose levels. Polyuria, increased body weight, elevated serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and TyG index was observed. Oxidative stress parameters showed increased levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and nitrites, along with decreased superoxide dismutase (SOD) activity in the liver. The pancreas exhibited acinar cell vacuolation and vessel congestion. Conversely, WGPF and RGPF treatments mitigated glycaemic and lipid disturbances, reduced uric acid, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) levels. These treatments also protected against elevated TBARS in the liver and preserved pancreatic beta islets from cytotoxicity associated with insulin resistance. These findings suggest that WGPF and RGPF offer a promising approach to mitigate T2DM's deleterious effects, supporting health-focused therapeutic and dietary strategies.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, grape pomace flour, arinto, touriga nacional, functional food, waste management

1. Introduction

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a multifactorial chronic and metabolic disease that has increased in prevalence worldwide. The IDF Diabetes Atlas (2021) reports an estimated prevalence of almost 11% adults, aged 20 to 79 years. In the context of T2DM, impaired insulin secretion by pancreatic β -cells dysfunction and insulin resistance due to signaling failure play significant roles (Singh *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022). Notably, there is a substantial decline in glucose tolerance in individuals with T2DM, which is accompanied by a reduction in pancreatic β -cell mass (WHO, 2019). In addition, hyperglycemia, dyslipidemia, oxidative stress and inflammation are involved in the pathogenesis of T2DM (Grabež *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). The development of T2DM has a multifactorial origin, triggered by genetic liability and/or environmental factors, and behavioral changes (Khutami *et al.*, 2022; Ahmad *et al.*, 2022).

Given the multitude of factors contributing to the pathophysiology of T2DM and its association with harmful micro and macrovascular outcomes, it is crucial to explore alternative treatments for the prevention and management of this condition (Zhou *et al.*, 2022). In recent years, notable reviews have highlighted the phytochemical and pharmacological effects of natural products, owing bioactive compounds with antioxidant, anti-obesogenic, anti-inflammatory, anti-aging, anti-hyperlipidemic properties in the context of T2DM (Devalajara *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2018; Averilla *et al.*, 2019; Gomez-Brandon *et al.*, 2019; Pivari *et al.*, 2019; Antonic *et al.*, 2020; Blahova *et al.*, 2021; Vivó-Barrachina *et al.*, 2022).

Grape (*Vitis vinifera* L. Vitaceae) is one of the most widely cultivated and popularly consumed fruit crops worldwide. According to the International Organization of Vine and Wine (OIV), the annual worldwide production of fresh grapes in 2019 reached approximately 85 million tons, with a significant portion of this harvest allocated for winemaking purposes (OIV, 2019). The winemaking industry, a significant global agro-industrial sector, generate a variety of industrial by-products and waste, thereby highlighting the importance of careful management to mitigate ecological impact (Averilla *et al.*, 2019). In this context, grape pomace, composed of stalks, skin, grape pulp cells and seeds, stands as the primary solid organic waste generated by winery industries and represents approximately 25% of grape mass (Beres *et al.*, 2017; Frum *et al.*, 2022). This by-product could be a valuable resource to be recycled, as it has been investigated as potential source of antioxidant phytochemicals due to its phenolic compounds with antioxidant properties and dietary fiber (Urquiaga *et al.*, 2015; Niwano *et al.*, 2017). Additionally, incorporation of GPF in baked products, such as crackers with increase in its nutritional properties (Marcos *et al.*, 2023).

In the light of contemporary environmental concerns and the growing desire for natural compounds offering health advantages, the conversion of grape pomace into a secure and usable format, with the goal of achieving full utilization and eco-friendly waste management, serves as a catalyst for the exploration of pragmatic solutions (Averilla *et al.*, 2019). In this sense, grape pomace flour (GPF) can be obtained through the drying and milling of pomace (Rivera *et al.*, 2019; Palma *et al.* 2020 and 2021). Due to its chemical composition and substantial biotechnological potential, GPF has recently been employed in studies that have demonstrated its anti-hyperglycemic, antioxidant, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic properties in both humans and animal models of metabolic syndrome (Hernandez-Salinas *et al.*, 2015; Urquiaga *et al.*, 2015 and 2018; Lanzi

et al., 2016), obesity (Charradi *et al.*, 2017), and atherosclerosis (Rivera *et al.*, 2019).

Vitis vinifera 'Touriga Nacional' and *Vitis vinifera* 'Arinto' are red and white grape cultivars, respectively, extensively cultivated in the European Union (Cabrita *et al.*, 2006). Notably, the GPF from these varieties has received favorable sensory evaluations when incorporated as ingredients in bakery products (Palma *et al.*, 2020 and 2021; Marcos *et al.*, 2023). In this sense, the aim of the present study was to investigate whether the administration of GPF from two varieties ("Arinto" and "Touriga Nacional") could prevent rats fed with a high-fat diet (HFD) and administered streptozotocin (STZ) against metabolic, biochemical, histological and oxidative alterations observed in an experimental model of T2DM.

2. Materials and methods

2.1. Grape pomace flours (GPF)

GP, a waste product from wine production, was obtained from a single production lot of red grapes from the variety 'Touriga Nacional' and white grapes from the variety 'Arinto' (Reguengos de Monsaraz, Alentejo region, Portugal) from Adega Cooperativa Carmim. After receipt, the samples were dried with an air circulation mechanism (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) for 24 hours at 60°C, ground in a domestic blade crusher (Moulinex, Alencon, France) to obtain GPF with particle size fraction $\leq 400 \mu\text{m}$. The samples were packed in 1-kilo propylene bags properly sealed and stored at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 weeks in a light-free place until use.

2.2. Diets

High fat diet (HFD) was prepared according to Oliveira *et al.* (2022) with some modifications and were provided *ad libitum* to the animals throughout the experimental period. All powdered ingredients were blended in a food processor (Mondial, Conceição do Jacuípe, Brazil). Subsequently, oil, lard, and water were added and processed until a homogeneous mixture was obtained. Finally, the dough was shaped into pellets and placed in an oven (Solab, Presidente Prudente, Brazil) at 60°C for 24 hours. The diets with the addition of WGPF and RGPF received a 10% increment of these flours and were chosen according to Kim *et al.* (2014), which were added to the mixture and homogenized in the processor until a homogeneous mixture was obtained. This mixture was then molded into pellets and subjected to the oven at 60°C for 24 hours. The normolipidic control diet offered was Socil® brand Autoclavable Rat and Mouse Feed, available at the Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas. According to the manufacturer, it has the following percentages: moisture: 12.5, crude protein: 23, ether extract: 4, ash: 9, crude fiber: 5, calcium - min (g/kg): 12, calcium - max (g/kg): 13, and phosphorus - min (g/kg): 8.5. Centesimal composition of the experimental diets is described on Table 1.

2.3. Animals

Forty adult male Wistar rats (90 days old, $403 \pm 34\text{g}$) were supplied by the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. The animals were kept a temperature-controlled environment ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), under the

12h light/dark cycle, free access to water and maintained in appropriate boxes, with a maximum of 4 animals per box. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). All of the procedures were approved by the Institutional Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA 033578/2022-14).

2.4. Experimental design

Rats were randomly divided into five groups: control diet/vehicle (CT), high-fat diet/vehicle (T2DM), HFD/Metformine (250mg/kg) (T2DM+Met), HFD supplemented with 10% of WGPF (T2DM+WGPF), or a high-fat diet supplemented with 10% RGPF (T2DM+RGPF) during 4 weeks. At day 21, T2DM groups received a single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (STZ) (35 mg/kg) dissolved in 0.01 M sodium citrate solution (Srinivasan *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2017). Body weight was recorded weekly and food and water intake were recorded daily.

2.5. Sample collection

After the 28-day experimental period and after 6h of fasting, the animals were euthanized. The blood was collected and centrifugated at 800g for 15 minutes and resulting serum was stored at -80°C for further biochemical assays. Liver was dissected and stored for further determination of oxidative stress parameters. The adipose tissue and pancreas were dissected and weighted, pancreas was stores for further histopathological assay.

2.6. Serum biochemical parameters

Measurements of serum glucose (mg/dL), total cholesterol (TC) (mg/dL), triacylglycerol (TAG) (mg/dL), cholesterol-HDL (mg/dL), urea (mg/dL), uric acid (mg/dL), creatinine (mg/dL), protein (mg/dL) levels and alanine aminotransferase (ALT) (U/L) and aspartate aminotransferase (AST) (U/L) activities were determined using commercially available diagnostic kits supplied by Labtest ® (Labtest, MG, Brazil). The fasting Triacylglycerol-glucose (TyG) index were calculated using the formula: $[\text{Triacylglycerol (mg/dL)} \times \text{Glucose (mg/dL)}] / 2$ according to Zhao *et al.* (2022).

2.7. Oxidative stress

Liver samples were homogenized in a sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing KCl. Subsequently, the homogenates were centrifugated at x rpm for 10 min at 4°C and the resulting supernatant was utilized for the assessment of oxidative stress. Protein concentration was determined by the methodologies established by Lowry *et al.* (1951) or Bradford (1976).

Reactive oxygen species (ROS)

Quantification of ROS production was determined by assessing the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) into fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), as described by Ali *et al.* (1992). This parameter is reported as μmol of DCF per mg of protein.

Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS)

TBARS, indicative of lipid peroxidation, were determined following the protocol delineated by Ohkawa *et al.* (1979) and reported as nmol TBARS/mg of protein.

Total sulfhydryl content (SH) assay

The SH content assay was conducted through the reduction of 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DTNB) by thiols, leading to the formation of oxidized disulfides (disulfide production), generating a yellow derivative (TNB), in accordance with the method outlined by Aksenov and Markesbery 2001. Results are reported as nmol of TNB per mg of protein.

Nitrite assay

The nitrite level was determined employing 1% sulfanilamide and 0.3% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride as reagents within the Griess reaction, following the protocol detailed by Stuehr and Nathan (1989). Results are expressed as μM of nitrite per mg of protein.

Superoxide Dismutase (SOD) activity

This quantification of SOD activity was based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation, as described by Misra and Fridovich (1972). The specific activity of SOD is reported as units per mg of protein.

Catalase (CAT) activity

CAT activity was measured by monitoring the depletion of H_2O_2 over a 90-second interval, according to the method of Aebi (1984). The results are reported as units per mg of protein.

2.8. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

After 72 hours of STZ administration and a 6-hour fasting period, the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed on all animals. This test involved monitoring blood glucose levels using a glucometer (AccuChek Guide, Roche Diagnostics®, USA) at 0, 30, 60, and 120 minutes after intragastric administration of a 50% D-glucose solution (2mg/g). Venous blood samples were obtained through a small tail puncture in the animals (Jiao *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2023).

2.9. Histopathology

Pancreas samples were collected, weighted fixed in 10% (pH 7.4) formaldehyde, processed by successive dehydrations with ethanol baths and embedded into paraffin blocks. Five micrometer thick sections (in duplicate) were cut, stained with haematoxylin-eosin (HE) and examined under light microscope.

2.10. Statistical analyses

Statistical analysis were performed using the software GraphPad Prism 8.0®. (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). Glucose tolerance was analyzed by repeated-measures ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test. Parametric variables were tested by one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test. Measured values were expressed as means \pm S.E.M and a value of $P \leq 0.05$ was considered to represent a significant difference in the analysis.

3. Results

3.1 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

To evaluate the glucose tolerance, all animals were subjected to the OGTT 72h after the STZ injection. As shown in Figure 1A, the co-administration of HFD alongside intraperitoneal injection of STZ exhibited a pronounced elevation in baseline glycemia within all diabetic cohorts ($P < 0.001$), as compared to the control (CT) group. By contrast, the administration of Metformin demonstrated a

protective effect against the surge in serum glucose concentration in the T2DM+Met group, relative to the T2DM group ($P<0.01$). At time points 30, 60, and 120 minutes following the oral glucose overload (2g/kg), a significant surge in glycemia was observed in the T2DM, T2DM+Met, WGPF, and RGPF groups in comparison to the CT group ($P<0.001$). Notably, these interventions failed to ameliorate this effect. Furthermore, it was evident that the Met-treated group displayed a reduction in glucose levels in contrast to the T2DM group at 30, 60, and 120 minutes ($P<0.001$, $P<0.001$, and $P<0.01$, respectively).

To confirm the significance of the observed changes, the Area Under the Curve (AUC) during the 120 min of OGTT was calculated for the five experimental groups. As illustrated in Figure 1B, the OGTT-AUC was significantly increased in the T2DM group when compared to the baseline and treatments, revealing the glucose intolerance exhibited by the T2DM group and the protection against this intolerance by Met, WGPF or RGPF treatment.

3.2 Metabolic and serum biochemical parameters

Table 2 presents data regarding feed consumption and water intake, and weight gain of the animals over the four-week experimental period. Within this context, it is noteworthy that the average feed consumption in grams during the pre-STZ or saline phase was significantly lower in the T2DM+Met ($P<0.001$) and T2DM+RGPF ($P<0.001$) groups when compared to the CT group while the T2DM+WGPF group exhibited higher feed consumption relative to the T2DM group ($P<0.05$). However, after the intraperitoneal administration of STZ or saline, a notable decrease in food consumption, measured in grams, was observed in the T2DM+Met, WGPF, and RGPF groups compared to the CT group ($P<0.01$). Furthermore, the average water intake in milliliters was lower in the T2DM+Met ($P<0.001$) and T2DM+RGPF ($P<0.05$) groups compared to the CT group. By contrast, a significant increase was observed after the STZ injection in the T2DM ($P<0.001$), T2DM+WGPF ($P<0.05$), and T2DM+RGPF ($P<0.05$) groups relative to the control group, while a significant reduction in water consumption was evident in the T2DM+Met group when compared to the T2DM group ($P<0.05$). Regarding the weight gain during the pre-STZ or saline phase, it was possible to observe that it was greater in the T2DM and T2DM+WGPF groups relative to the CT group ($P<0.05$). Meanwhile, no significant differences were observed within the experimental groups after the STZ injection ($P>0.05$). These results are described in Figure 2 where the weight gain curve shows that the initial weight of the T2DM+Met group ($P<0.01$) was significantly higher than the CT group. Additionally, it was possible to observe a growing and significative higher body weight of T2DM, T2DM+Met and T2DM+WGPF when compared to the CT group on the first ($P<0,05$, $P<0,05$ e $P<0,01$, respectively), second ($P<0,05$, $P<0,01$ e $P<0,001$, respectively) and third ($P<0,05$, $P<0,05$ e $P<0,001$, respectively) weeks of the experimental protocol. Furthermore, it is possible to observe the weight loss after the STZ injection at the end of the protocol of all diabetic groups, whereas no significant differences on the total weight gain could be observed ($P>0.05$). In terms of relative weight of the pancreas, no significant differences were discernible among any of the experimental groups at the end of the experiment ($P>0.05$). Nevertheless, the results pertaining to the relative weight gain of visceral adipose tissue exhibited a noteworthy increase in this parameter within the T2DM+WGPF group in comparison to the CT group ($P<0.05$).

Figure 3 (A-D) presents the results regarding the serum biochemical profile, in which is possible to observe significant changes in the T2DM group compared to the CT group with respect to blood glucose ($P<0.001$), TG ($P<0.001$) and cholesterol ($P<0.01$) levels. In contrast, when compared to the T2DM group, the groups that received Met, WGPF or RGPF had lower blood glucose ($P<0.05$, $P<0.001$ and $P<0.01$, respectively) and TG ($P<0.001$). In addition, it was possible to observe higher cholesterol levels on the T2DM when compared to the CT group ($P<0.01$) and elevated HDL-levels on the T2DM+RGPF when compared to the control ($P<0.05$).

The TyG index was higher as a result of the combination HFD and STZ injection on all diabetic groups (T2DM, $P<0,001$, T2DM+Met, $P<0,05$, T2DM+WGPF, $P<0,001$ and T2DM+RGPF, $P<0,001$) when compared to the CT. On the other hand, treatment with Met, WGPF and RGPF decreased this index with respect to the T2DM group ($P<0,001$, $P<0,05$ and $P<0,05$, respectively) (Figure 4).

Table 3 shows the results relative to serum levels of hepatic and renal damage. In regard to the uric acid levels, it is possible to observe a significant reduction in T2DM+Met ($P<0.01$), T2DM+WGPF ($P<0.05$) and T2DM+RGPF ($P<0.01$) when compared to the CT group. In respect to the activity of the transaminase's enzymes, it was possible to observe a significant reduction of AST activity in the T2DM+WGPF group when compared to the CT and T2DM ($P<0.01$) and a significant increase in ALT activity on T2DM when compared to CT group ($P<0.05$), however the treatments with WGPF ($P<0.001$) and RGPF ($P<0.01$) were capable of significantly mitigate these alterations. Furthermore, it was possible to observe significant changes in creatinine levels on the T2DM non-treated when compared to the CT ($P<0.05$). Finally, according to serum levels of urea and protein there was no significant changes ($P>0.05$).

3.3 Oxidative stress parameters in liver

The liver oxidative stress parameters are listed in Table 4. Firstly, it was possible to observe that the coadministration of HFD + moderate STZ-dose injection was capable of increasing total thiolic content in T2DM, T2DM+Met, T2DM+WGPF and T2DM+RGPF groups ($P<0.001$) compared to the CT group. By contrast, the groups that received WGPF ($P<0.001$) and RGPF ($P<0.01$) had lower levels of TBARS when compared to the T2DM group ($P<0.05$). In regard to ROS levels, no significant difference was noted between the groups ($P>0.05$). Nitrite levels were increased in all diabetic groups, whereas the treatments were not capable of preventing it ($P<0.001$). When evaluating the activity of the antioxidant enzymes CAT and SOD, we observed that there was no significant difference between the groups ($P>0.05$). In contrast, it was possible to observe a significant reduction on SOD activity on T2DM ($P<0.001$), T2DM+Met ($P<0.001$), T2DM+WGPF ($P<0.001$) and T2DM+RGPF ($P<0.01$) when compared to the CT.

3.4 Histopathological analyses of the pancreas

Figure 5 displays the results of the histological analysis of the pancreas. In this regard, the pancreatic tissue of the CT group exhibited a typical organization in lobes and lobules, intact acinar cells, and easily visualized and structurally characteristic islets (Figure 5A-C). On the other hand, T2DM group showed changes in the typical structure of Langerhans islets, increased intercellular spaces, the presence of vacuoles in certain acinar cells, and vascular congestion (Figure 5D-F). Meanwhile, the pancreas of animals in the T2DM+Met (Figure 5G-

l) did not show important cellular changes. Similarly, the pancreatic structure assessed through histological analysis of the T2DM+WGPF group, exhibited an intact structure and characteristics similar to the CT group, although swollen acinar cells with vacuoles and congested vessels could be observed (Figure 5J-L). Finally, in the histological analysis of the pancreas in the T2DM+RGPF group, some congested vessels and acinar cells with swollen vacuoles were observed. The pancreatic islets exhibited an intact structure and were more numerous compared to the CT group, although some of them displayed spaces (Figure 5M-O).

4. Discussion

The most cultivated grape species for winemaking is *Vitis vinifera* (Beres *et al.*, 2017). Since the 1990s, moderate consumption of grapes and wine, has been associated with a reduction in mortality rates and the incidence of cardiovascular disease (Renauld and Lorgeil, 1992). This phenomenon, known as the “French Paradox”, links the cardioprotective effects of grape consumption and its byproducts to their ability to prevent platelet aggregation and modify serum lipid profiles due to the action of phenolic compounds (Muñoz-Bernal *et al.*, 2021). Since then, wine consumption has been on the rise worldwide, and as a result, there has been an increase in the production of by-products in the wine industry, drawing attention due to its significant economic and environmental impact (Gómez-Brandón *et al.*, 2019).

Grape pomace, the primary by-product of wine production, comprises approximately 70% of the grape's phenolic compounds that remain in the pomace after the wine extraction process (Beres *et al.*, 2017). These compounds have piqued significant scientific interest due to their antioxidant, cardioprotective, and potential hypoglycemic effects (Muñoz-Bernal *et al.*, 2018; Chedea *et al.*, 2022; Taladrid *et al.*, 2023). In this sense, a practical alternative is to convert the pomace into GPF (Ferreira and Santos, 2022). According to the literature, the main bioactive compounds found in grape pomace include polyphenols, anthocyanins, resveratrol, flavonols, catechins and proanthocyanidins (Correia and Jordão, 2015; Moreira *et al.*, 2018; Averilla *et al.*, 2019).

In a global public health context, T2DM emerges as a serious concern, with projections continually exceeding expectations in each new screening, resulting in a significant annual financial impact (DSDB, 2022). The current study was designed to investigate the effects of treatment with GPF derived from the grape cultivars ‘Arinto’ (WGPF) and ‘Touriga Nacional’ (RGPF) on metabolic, serum biochemical, oxidative and histological parameters in rats induced to an experimental model of T2DM by the co-administration of HFD administration, and subsequently a low-dose STZ injection. We found that consumption of WGPF and RGPF, used in this study, significantly influenced the markers of oxidative stress in the liver, lipid and glycemic profile and pancreatic structure in T2DM Wistar rats.

In the regard of the anthropometric parameters investigated in the present study, a significant reduction in feed intake was observed in all T2DM groups after intraperitoneal STZ injection on the 21st day, leading to the significant loss of body weight. The treatments with WGPF or RGPF were not able to prevent these effects. These results align with previous findings by Correia-Santos *et al.* (2012), who demonstrated in an experimental T2DM model a reduction in food intake in

female Wistar rats fed HFD or a control diet after intraperitoneal STZ injection, along with polyuria and significant weight loss due to the hyperglycemia induced by the experimental model. In this regard, these results are consistent with literature findings observed by Kobayashi *et al.* (2017), where the reduction in food intake in mice subjected to T2DM by STZ injection in the early days is attributed to immediate adverse effects, which may include nausea and diarrhea. On the other hand, these disruptions can be alleviated in the days following STZ injection, as observed by Giribabu *et al.* (2017), where the consumption of grape seed extract at different concentrations mitigated weight loss in STZ-induced diabetic rats during a 28-day follow-up after induction.

Dysregulation of carbohydrate, lipid, and protein metabolism are central pathological features of T2DM. These factors lead to severe consequences, including long-term dysfunctions in physiological functioning of untreated patients experiencing chronic hyperglycemia (Alfheaid *et al.*, 2023). Previous observations have suggested the key role of dietary polyphenols and fiber in the improvement of lipid and glycemic profiles (Amiot *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Peixoto *et al.*, 2018). Corroborating with the findings of the present study, Rodriguez Lanzi *et al.* 2016 reported that the administration of grape pomace was effective in reducing TG concentrations in an animal model of Metabolic Syndrome induced by a high-fat and fructose diet. Furthermore, Ferri *et al.* 2015 observed the cholesterol-lowering activity of grape pomace on significantly induction of transcriptional activity of cholesterol 7 α hydroxylase (*cyp7a1*), the rate-limiting enzyme in bile acid formation, which is a key step in maintaining intracellular cholesterol homeostasis. Moreover, the potential anti-hyperlipidemic effect of grape pomace may be attributed to a synergistic action of bioactive compounds and dietary fiber. The soluble fiber in grape pomace has the capacity to inhibit lipid emulsification, consequently affecting triglyceride hydrolysis (Taladrid *et al.*, 2023). Simultaneously, the antioxidant phenolic compounds present in grape pomace may contribute to the modulation of cholesterol absorption. This effect can be attributed to GPF's ability to disrupt cholesterol micelles, decreasing their solubility and availability. This process facilitates cholesterol excretion through the modulation of bile salts (Rahbar, Mahmoudabadia and Islam, 2015; Rivera *et al.*, 2019).

One of the pharmacological mechanisms of some antidiabetic synthetic drugs is the inhibition of digestive enzymes, such as α -amylase and α -glucosidase, for modulating post prandial hyperglycemia (Cisneros-Yupanqui *et al.*, 2023). However, it causes undesirable side-effects such as gastrointestinal discomfort and lactic acidosis, corresponding to a loss of nutrient absorption (Wang *et al.*, 2020). In this sense, studies have demonstrated the role of grape pomace in inhibiting these pharmacological targets without the associated adverse effects. Sun *et al.* 2016 could isolate a specific α -glucosidase inhibitor, 6-O-D-glycosides from 'Tinta Cão' grape pomace. Additionally, Kato-Schwartz *et al.* 2020 suggested that the phenolic compounds catechin, quercetin-3-O-glucuronide, peonidin-3-O-acetylglucoside, and isorhamnetin-3-O-glucoside were the potential polyphenols responsible for α -amylase inhibition observed in the Merlot grape pomace. In this regard, Kadough *et al.* 2016 observed greater enzymatic inhibition with higher phenolic content. Altogether, these findings suggest the potential of grape pomace in diabetes control and prevention. In our study, the hypoglycemic effects of WGPF and RGPF was observed in total AUC OGTT values. According to the

literature, the postprandial hypoglycemic effects of grape by-products depend on the administered dose and the concurrent diet (Urquiaga *et al.*, 2018) as for the duration of the experimental period (Martínez-Maqueda *et al.*, 2018).

Accordingly, the TyG index serves as a reliable marker of insuline resistance as it demonstrates agreement with the hyperinsulinemic euglycemic clamp method, a gold standard for diagnosing this condition (Tao *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022). Moreover, the TyG index reflects both glycemic status and cardiovascular health (Selvi *et al.*, 2021), being strongly associated with cardiovascular complications in T2DM patients (Grabež *et al.*, 2022). The data presented in our study are consistent with the indication of increased cardiovascular risk in T2DM, while treatments with Met, WGPF, or RGPF demonstrated potential protective effects. These results align with the findings of De Morais *et al.* (2021), who demonstrated an increase in the TyG index associated with elevated TG and glucose concentrations in rats fed a concentrated sucrose solution and treated with pterostilbene, a resveratrol analog. Additionally, Alarcon *et al.* (2017) observed an elevated TyG index and C-reactive protein in metabolically obese but normal-weight rabbits fed with an HFD. They emphasize the role of an inappropriate diet, particularly one high in lipids and/or carbohydrates, in increasing cardiovascular risk, even in individuals with a healthy weight.

Oxidative stress represents one of the main mechanisms in the development of insulin resistance and associated complications in T2DM as it involves pathophysiological alterations at molecular level and disrupts metabolic pathways (Yaribeygi *et al.*, 2020). Previous observations have demonstrated the association of oxidative stress and liver dysfunction, leading to structural changes, disturbance in the biosynthesis of endogenous molecules and physiological maintenance of the organism (Mossa *et al.* 2015). In this regard, the body can rely on both endogenous (enzymatic and non-enzymatic) and exogenous (through dietary intake) antioxidant. In the present study, a significant increase in total thiol content was observed in all T2DM groups, and these increases were not reversed by the treatments. Such effect may be attributed to the innate adaptive response of the body to the higher antioxidant demand induced by the oxidative stress observed in T2DM. Similarly, Buchner *et al.* (2014), observed hepatoprotective effects against dysfunctions caused by the administration of a HFD in Wistar rats treated with a chronic administration of both conventional (*Vitis labrusca*) and organic grapes.

Moreover, the experimental induction of T2DM leads to elevated lipid peroxidation and nitrite levels in the liver, what could be related to impaired antioxidant enzyme activity, particularly a reduction in SOD activity. In this sense, treatment with WGPF and RGPF, partially mitigated these effects, suggesting a moderate protective role. This aligns with previous studies on the potential hepatoprotective effects of grape-derived compounds (Schmatz *et al.*, 2012; Quatrin *et al.*, 2018; Samadi-Noshahr *et al.*, 2020). Nonetheless, oxidative stress in T2DM remains a complex issue, and further research is needed to fully understand the underlying mechanisms and the potential of grape pomace by-products as therapeutic agents.

Pancreatic β -cell dysfunction, induced by injurious factors, is one of the primary contributors to diabetes pathogenesis. In this context, STZ, a glycosamine-nitrosourea compound, is significantly toxic to mammalian pancreatic β -cells. Its

toxic action is not limited solely to pancreatic cells but can also affect other tissues, such as the liver (Duan *et al.*, 2022). Therefore, when combined with the metabolic effects of a HFD consumption, the administration of a low single dose of STZ (35 mg/kg) reproduces a widely used experimental model of T2DM in the literature (Srinivasan *et al.* 2005; Singh *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2023). This model induces dysfunction in pancreatic cell function, resulting in structural cell alterations, vacuole formation, and vessel congestion (Deeds *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2022), which are consistent with the results observed in the present study. On the other hand, treatment with Met, WGPF or RGPF proved to be effective in protecting pancreatic tissue against these changes.

5. Conclusion

Altogether, our findings demonstrate that treatment with WGPF or RGPF improves some components of T2DM, as glycemic, lipidic and histological alterations. Moreover, the phenolic and dietetic fiber present in GPF diminished oxidative lipidic damage, contributing to a better handling of liver oxidative stress. These findings contribute to a better understanding of the effects of grape by products on T2DM signals, and may provide new perspectives for future studies.

Authors' contributions

RCP: conceived the study design, performed data analysis, and wrote the manuscript. RCP, WSS, SVC, KCMG, JEM, ACT and KPL: performed the experiments. MLP, MN, PP: provided the pomaces. BFD: conducted histopathological analysis. AGB: conducted the biochemical assay. RMS, FMS and RGT: supervised the scientific work and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that there is no financial or personal relationship that could present a potential conflict of interests.

Data availability statement

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

This study was funded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, CNPq and FAPERGS.

References

[IDF] International Diabetes Federation. Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021.

Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. 2022. Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. *Molecules*. 30;27(3):950.doi: 10.3390/molecules27030950.

Zhou Z, Sun B, Yu D, Zhu C. 2022. Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Cell Infect Microbiol.* 15:12:834485.doi: 10.3389/fcimb.2022.834485. eCollection 2022.

[WHO] World Health Organization. Classification of diabetes mellitus. 2019.

Grabež M, Škrbić R, Stojiljković MP, Vučić V, Grujić VR, Jakovljević V, Djuric DM, Suručić R, Šavikin K, Bigović D, Vasiljević N. 2021. A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of polyphenols on the outcomes of inflammatory factors and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Rev. Cardiovasc. Med.*, 23(2), 57. <https://doi.org/10.31083/j.rcm2302057>.

Khutami C, Sumiwi SA, Ikram NKK, Muchtaridi M. 2022. The Effects of Antioxidants from Natural Products on Obesity, Dyslipidemia, Diabetes and Their Molecular Signaling Mechanism. *Int J Mol Sci.*12;23(4):2056. doi: 10.3390/ijms23042056.

Ahmad E, Lim S, Lamptey R, Webb DR, Davies MJ. 2022. Type 2 diabetes. *Lancet.* 19;400(10365):1803-1820. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01655-5.

Devalaraja, S., Jain, S., and Yadav, H., 2011. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. *Food research international*, 44 (7), 1856–1865. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.008

Xu L, Li Y, Dai Y, Peng J. 2018. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacol Res.* 130:451-465. doi: 10.1016/j.phrs.2018.01.015.

Averilla JN, Oh J, Kim HJ, Kim JS, Kim JS. 2019. Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food Sci Biotechnol.* 2019 Dec; 28(6): 1607–1615. doi: 10.1007/s10068-019-00628-2

Gómez-Brandón M, Lores M, Insam H, Domínguez J. 2019. Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Crit Rev Biotechnol.* 39(4):437-450. doi: 10.1080/07388551.2018.1555514.

Pivari F, Mingione A, Brasacchio C, Soldati L. 2019. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Nutrients.* 8;11(8):1837. doi: 10.3390/nu11081837.

Antonić B, Jančiková S, Dordević D, Tremlová B. 2020. Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods.* 7;9(11):1627. doi: 10.3390/foods9111627.

Blahova J, Martiniakova M, Babikova M, Kovacova V, Mondockova V, Omelka R. 2021. Pharmaceutical Drugs and Natural Therapeutic Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmaceuticals (Basel).* 17;14(8):806. doi: 10.3390/ph14080806.

Vivó-Barrachina, L., Rojas-Chacón, M.J., Navarro-Salazar, R. et al. (2022). The Role of Natural Products on Diabetes Mellitus Treatment: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Pharmaceutics*, 14, 101. doi: 10.3390/pharmaceutics14010101.

[OIV] International Organization of Vine and Wine, Report 2019.

Beres C, Costa GNS, Cabezudo I, James NKS, Teles ASC, Cruz APG, Silva CM, Tonon RV, Cabral LMC, Freitas SP. 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management* 68 (2017) 581–594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>.

Frum A, Dobrea CM, Rus LL, Virchea LI, Morgovan C, Chis AA, Arseniu AM, Batuca A, Gligor FG, Vicas LG et al. 2022. Valorization of Grape Pomace and Berries as a New and Sustainable Dietary Supplement: Development, Characterization, and Antioxidant Activity Testing. *Nutrients*. 14(15): 3065. Published online 2022 Jul 26. doi: 10.3390/nu14153065

Urquiaga I, D'Acuña S, Pérez D, Dicenta S, Echeverría G, Rigotti A, Leighton F. 2015. Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: a randomized controlled trial. *Biol Res* 48, 49 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0040-9>.

Niwano Y, Tada M, Tsukada M. 2017. Antimicrobial Intervention by Photoirradiation of Grape Pomace Extracts via Hydroxyl Radical Generation. *Front. Physiol.*, 21:8:728. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00728>

Marcos J, Carriço R, Souza MJ, Palma ML, Pereira P, Nunes MC, Nicolai M. 2023. Effect of Grape Pomace Flour in Savory Crackers: Technological, Nutritional and Sensory Properties. *Foods*, 12:1392. <https://doi.org/10.3390/foods12071392>

Rivera K, Salas-Pérez F, Escheverría G, Urquiaga I, Dicenta Sara, Pérez D, de la Cerda P, González L, Andia ME, Uribe S. et al. 2019. Red Wine Grape Pomace Attenuates Atherosclerosis and Myocardial Damage and Increases Survival in Association with Improved Plasma Antioxidant Activity in a Murine Model of Lethal Ischemic Heart Disease. *Nutrients*, 11(9), 2135; <https://doi.org/10.3390/nu11092135>

Palma ML, Nunes MC, Rita G, Rodrigues M, Gothe S, Tavares N, Pego C, Nicolai M, Pereira P. 2020. Preliminary sensory evaluation of salty crackers with grape pomace flour. *Biomed Biopharm Res*. 17(1): 33-43. doi: 10.19277/bbr.17.1.222

Palma ML, Pêgo-Ferreira C, Nicolai M, Pereira P. 2021. Preliminary sensory evaluation of grape pomace flour sweet cookies. *Biomed Biopharm Res*. 18(1); 92-102. doi: 10.19277/bbr.18.1.249

Hernández-Salinas R, Decap V, Leguina A, Cáceres P, Perez D, Urquiaga R, Velarde. 2015. Antioxidant and anti hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a high fructose diet. *Biol Res*. 30:48:53. doi: 10.1186/s40659-015-0045-4.

Urquiaga I, Troncoso D, Mackenna MJ, Urzúa C, Pérez D, Dicenta S, de la Cerda PM, Amigo L, Carreño JC, Echeverría G. et al. 2018. The Consumption of Beef Burgers Prepared with Wine Grape Pomace Flour Improves Fasting Glucose, Plasma Antioxidant Levels, and Oxidative Damage Markers in Humans: A Controlled Trial. *Nutrients*. 1;10(10):1388. doi: 10.3390/nu10101388.

Lanzi CR, Perdicaro DJ, Antonioli A, Fontana AR, Miantello RM, Bottini R, Prieto MAV. 2016. Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling

in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. *Food Funct.* 7(3):1544-53. doi: 10.1039/c5fo01065a.

Charradi K, Mahmoudi M, Bedhiafi T, Kadri S, Elkahoui S, Limam F, Aouani E. 2017. Dietary supplementation of grape seed and skin flour mitigates brain oxidative damage induced by a high-fat diet in rat: Gender dependency. *Biomed Pharmacother.* 87:519-526. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.015.

Cabrita MJ, Freitas AMCF, Laureano O, Di Stefano R. 2006. Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars. *J Sci Food Agric* 86:922–931. DOI: 10.1002/jsfa.2439.

Oliveira JS, Silva AAN, Dias FCR, Oliveira EL, Filho EFO, Soares PC, Ferreira CMO, Junior VASJ. 2022. Histomorphometric and oxidative evaluation of the offspring's testis from type 2 diabetic female rats treated with metformina and pentoxifylline. *Int J Exp Pathol.* 103(5):174-189. doi: 10.1111/iep.12446.

Kim H, Bartley GE, Arkiv T, Lipson R, Nah SY, Seo K, Yokoyama W. 2014. Dietary Supplementation of Chardonnay Grape Seed Flour Reduces Plasma Cholesterol Concentration, Hepatic Steatosis, and Abdominal Fat Content in High-Fat Diet-Induced Obese Hamsters. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 1919–1925. dx.doi.org/10.1021/jf404832s

Srinivasan K, Asrat BVL, Kaul CL, Ramarao P. 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 52(4):313-20. doi: 10.1016/j.phrs.2005.05.004.

Singh, S, Sharma RK, Malhotra S, Poshruraju R, Shandilya UK. 2017. *Lactobacillus rhamnosus* NCD17 ameliorates type-2 diabetes by improving gut function, oxidative stress and inflammation in high-fat-diet fed and streptozotocin treated rats. *Beneficial microbes,* 8 (2), 243–255. doi: 10.3920/BM2016.0090.

Zhao, J., Fan, H., Wang, T. Yu B, Mao S, Wang X, Zhang W, Wang L, Zhang Y, Ren Z. et al. 2022. TyG index is positively associated with risk of CHD and coronary atherosclerosis severity among NAFLD patients. *Cardiovasc Diabetol* 21, 123. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01548-y>

Lowry OH, Rosebrough N, Farr AL, Randall R, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry,* 193 (1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal biochem.,* 72, 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

Ali, S.F., Lebel, C.P., and Bondy, S.C., 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology,* 13 (3), 637–648.

Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal biochem.* 95 (2), 351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.

- Aksenov, M.Y., and Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.*, 302 (2-3), 141–145. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01636-6.
- Stuehr, D.J., and Nathan, C.F., 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *The journal of experimental medicine*, 169 (5), 1543–1555. doi: 10.1084/jem.169.5.1543.
- Misra, H.P., and Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 247 (10), 3170–3175.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121–126. 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- Jiao Y, Wang X, Jiang X, Kong F, Wang S, Yan C. 2017. Antidiabetic effects of Morus alba fruit polysaccharides on high-fat-diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *J ethnopharmacol.*, 199, 119–127. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.003.
- Cardoso JS, Teixeira FC, de Mello JE, de Aguiar MSS, Oliveira OS, Saraiva JT, Vizzotto M, Grecco FB, Lencina CL, Spanevello RM. Et al. 2023. Psidium cattleianum fruit extract prevents systemic alterations in an animal model of type 2 diabetes mellitus: comparison with metformin effects, *Biomarkers*, 28:2, 238-248, DOI: 10.1080/1354750X.2022.2163695.
- Renaud S, Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 20;339(8808):1523-6. doi: 10.1016/0140-6736(92)91277-f.
- Muñoz-Bernal AO, Coria-Oliveros AJ, de la Rosa LA, Rodrigo-García J, Martínez-Ruiz NR, Sayago-Ayerdi SG, Alvarez-Parrilla E. 2021. Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *Food Res Int.* 140:110069. doi: 10.1016/j.foodres.2020.110069.
- Muñoz-Bernal, AO, Rodrigo-Garcia J, Martinez-Ruiz N, García-Fajardo J, Alvarez-Parrilla E. 2018. Orujo de uva como ingrediente de alimentos funcionales. 1st edition. p.457–492
- Chedea VS, Macovei SO, Bocsan IC, Măgureanu DC, Levai AM, Buzoianu AD, Pop RM. 2022. Grape Pomace Polyphenols as a Source of Compounds for Management of Oxidative Stress and Inflammation—A Possible Alternative for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs? *Molecules*. 12;27(20):6826. doi: 10.3390/molecules27206826.
- Taladrid D, Rebollo-Hernanz M, Martin-Cabrejas MA, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. 2023. Grape Pomace as a Cardiometabolic Health-Promoting Ingredient: Activity in the Intestinal Environment. *Antioxidants*. 21;12(4):979. doi: 10.3390/antiox12040979.
- Ferreira SM and Santos L. 2022. A Potential Valorization Strategy of Wine Industry by-Products and Their Application in Cosmetics—Case Study: Grape

Pomace and Grape seed. *Molecules*. 31;27(3):969. doi: 10.3390/molecules27030969.

Correia AC and Jordão AM. 2015. Antioxidant capacity, radical scavenger activity, lipid oxidation protection analysis and antimicrobial activity of red grape extracts from different varieties cultivated in Portugal. *Natural Product Research*. 29(5):438-40. doi: 10.1080/14786419.2014.945086.

Moreira MM, Barroso MF, Porto JV, Ramalhosa MJ, Švarc-Gajić J, Estevinho L, Morais S, Delerue-Matos C. 2018. Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Sci Total Environ*. 1:634:831-842. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.035.

[DSDB] DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2022. Available on: <https://diretriz.diabetes.org.br/>.

Correia-Santos AM, Suzuki A, Anjos JS, Rêgo TS, Almeida KCL, Boaventura GT. 2012. Induction of Type 2 Diabetes by low dose of streptozotocin and high-fat diet-fed in wistar rats. *Medicina (Ribeirão Preto)* 45(4): 436-44.

Kobayashi M, Kurata T, Hamana Y, Hiramitsu M, Inoue T, Murai A, Horio F. 2017. Coffee Ingestion Suppresses Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. (3):200-207. doi: 10.3177/jnsv.63.200.

Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Kassim NM, Salleh N. 2018. Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic and Pro-Proliferative Effects of *Vitis Vinifera* Seed Ethanolic Extract in the Liver of Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Diabetes in Male Rats. *Can J Diabetes*. 42(2):138-149. doi: 10.1016/j.jcjd.2017.04.005.

Alfheaid HA, Alhowail AA, Ahmed F, Zaki AKA, Alkhalidy A. 2023. Effect of Various Intermittent Fasting Protocols on Hyperglycemia-Induced Cognitive Dysfunction in Rats. *Brain Sci*. 13(2): 165. doi: 10.3390/brainsci13020165

Amiot MJ, Riva C, Vinet A. 2016. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review, *obesity reviews*. 17(7):573-86. doi: 10.1111/obr.12409.

Kim Y, Keogh JB and Clifton PM. 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*. 8(1): 17. Published online 2016 Jan 5. doi: 10.3390/nu8010017.

Peixoto CM, Dias MI, Alves MJ, Calhela RC, Barros L, Pinho SP, Ferreira ICFR. 2018. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chem*. 1:253:132-138. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.163.

Ferri M, Bin S, Vallini V, Fava F, Michelini E, Roda A, Minnucci G, Bucchi G, Tassoni A. 2015. Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *N Biotechnol*. 25;33(3):338-44. doi: 10.1016/j.nbt.2015.12.004.

Rahbar AR, Mahmoudabadi MMS and Islam MS. 2015. Comparative effects of red and white grapes on oxidative markers and lipidemic parameters in adult hypercholesterolemic humans. *Food Funct*. 6(6):1992-8. doi: 10.1039/c5fo00100e.

Cisneros-Yupanqui M, Lante A, mihaylova D, Krastanov AI, Rizzi C. 2023. The α -Amylase and α -Glucosidase Inhibition Capacity of Grape Pomace: A Review. *Food Bioproc Tech.* 16(4): 691–703. doi: 10.1007/s11947-022-02895-0

Wang M, Chen J, Ye X, Lu D. 2020. *In vitro* inhibitory effects of Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves proanthocyanidins on pancreatic α -amylase and their interaction. *Bioorg Chem.* 101:104029. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104029

Sun S, Kadough HC, Zhu W, Zhou K. 2016. Bioactivity-guided isolation and purification of α -glucosidase inhibitor, 6-O-D-glycosides, from Tinta Cão grape pomace. *J Funct Foods.* 23:573-579. doi: 10.1016/j.jff.2016.03.009.

Kato-Schwartz CG, Corrêa RCG, Lima DS, Sá-Nakanishi AB, Gonçalves GA, Seixas FAV, Haminiuk CWI, Barros L, Ferreira ICFR, Bracht A et al. 2020. Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: An in vitro, in silico and in vivo study of α -amylase and α -glucosidase inhibition. *Food Res Int.* 137:109462. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109462.

Kadouh HC, Sun S, Zhu W, Zhou K. 2016. α -Glucosidase inhibiting activity and bioactive compounds of six red wine grape pomace extracts. *J Funct Foods.* 26:577-584. doi: 10.1016/j.jff.2016.08.022.

Martínez-Maqueda D, Zapatera B, Gallego-Narbón A, Vaquero MP, Saura-Calixto F, Pérez-Jiménez J. 2018. A 6-week supplementation with grape pomace to subjects at cardiometabolic risk ameliorates insulin sensitivity, without affecting other metabolic syndrome markers. *Food Funct.* 9, 6010-6019. doi: 10.1039/c8fo01323c.

Tao LC, Xu JN, Wang TT, Hua F, Li JJ. 2022. Triglyceride-glucose index as a marker in cardiovascular diseases: landscape and limitations. *Cardiovasc Diabetol.* 6;21(1):68. doi: 10.1186/s12933-022-01511-x.

Selvi NMK, Nandhini S, Sakthivadivel V, Lokesh S, Srinivasan AR, Sumathi S. 2021. Association of Triglyceride–Glucose Index (TyG index) with HbA1c and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Maedica (Bucur).* 16(3): 375–381. doi: 10.26574/maedica.2021.16.3.375.

De Morais JMB, Cruz ems, Rosa CVD, Cesário RC, Comar JF, Moreira CCL, Chuffa LGA, Seiva FRF. 2021. Pterostilbene influences glycemia and lipidemia and enhances antioxidant status in the liver of rats that consumed sucrose solution. *Life Sci.* 15:269:119048. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119048.

Alarcon G, Roco J, Medina M, Medina A, Peral M, Jerez S. 2018. High fat diet-induced metabolically obese and normal weight rabbit model shows early vascular dysfunction: mechanisms involved. *Int J Obes (Lond).* 42(9):1535-1543. doi: 10.1038/s41366-018-0020-6.

Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. 2020. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev.* 8609213. doi: 10.1155/2020/8609213

Mossa, ATH, Ibrahim FM, Mohafrash SMM, Baker DHA, Gengaihl SL. 2015. Protective Effect of Ethanolic Extract of Grape Pomace against the Adverse

Effects of Cypermethrin on Weanling Female Rats. *E vid Based Complement Alternat Med.* 381919. doi: 10.1155/2015/381919.

Buchner I, Medeiros N, Lacerda DDS, Normann CABM, Gemelli T, Rigon P, Wannmacher CMD, Henriques JAP, Dani C, Funchal C. 2014. Hepatoprotective and Antioxidant Potential of Organic and Conventional Grape Juices in Rats Fed a High-Fat-Diet. *Antioxidants (Basel).* 30;3(2):323-38. doi: 10.3390/antiox3020323.

Schmatz R, Pereira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J, Bagatini M, Martins CC, Abdalla FH, Serres JDS et al. 2012. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie.* 94(2):374-83. doi: 10.1016/j.biochi.2011.08.005.

Quatrin A, Conte L, Silva DT, Figueiredo CG, Somacal S, Roehrs M, Teixeira CF, Barbisan F, Augusti PR, Júnior MRM et al. 2018. The Hepatoprotective Effect of Jaboticaba Peel Powder in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Involves the Modulation of Thiol/Disulfide Redox State through the Upregulation of Glutathione Synthesis. *J Nutr Metab.* 1:2018:9794629. doi: 10.1155/2018/9794629.

Samadi-Noshahr Z, Hadjzadeh MAR, Moradi-Marjaneh R, Khajavi-Rad A. 2021. The hepatoprotective effects of fennel seeds extract and trans-Anethole in streptozotocin-induced liver injury in rats. *Food Sci Nutr.* 9(2): 1121–1131. Published online 2020 Dec 30. doi: 10.1002/fsn3.2090

Duan J, Yang M, Liu Y, Xiao S, Zhang X. 2022. Curcumin protects islet beta cells from streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus injury via its antioxidative effects. *Endokrynol Pol.* ;73(6):942-946. doi: 10.5603/EP.a2022.0070.

Deeds MC, Anderson JM, Armostrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC. 2011. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim.* 45(3):131-40. doi: 10.1258/la.2010.010090.

Table 1: Centesimal composition and caloric value of experimental diets

Determination	HFD	HFD + 10% of WGPF	HFD + 10% of RGPF
Umidity (%)	13,04±0,19	12,09±0,16**	14,83±0,21***
Ash (%)	3,83±0,21	3,53±0,01	3,07±0,45*
Lipidis (%)	15,95±0,07	14,91±0,52	14,79±2,83
Protein (%)	10,93±0,25	10,04±0,04*	10,87±0,01
Crude fiber (%)	ND	0,44±0,01	0,66±0,01*
Total carbohydrates (%)	56,25	58,99	55,78
Caloric value (Kcal)	82,5	82,1	79,9**

Means of three repetitions \pm standard deviation estimate. *** represents $P < 0.001$, ** represents $P < 0.01$, and * represents $P < 0.05$ when compared to the HFD formulation. *Calculated as the difference between the sum of moisture, ash, lipids, and proteins, subtracted from 100. ** Energy value corresponding to a 20g portion. HFD, high-fat diet; WGPF, white grape pomace flour; RGPF, red grape pomace flour; ND, not detected.

Table 2: Effect of the administration of a high-fat diet and STZ, and treatment with Met and WGPF or RGPF on food consumption, water intake, total weight gain, relative pancreas weight, and adipose tissue weight.

	CT	T2DM	T2DM+Met	T2DM+WGPF	T2DM+RGPF
Pre STZ or saline					
Feed consumption (g/day)	25,76±0,67	21,35±1,46	18,48±0,92***	23,93±1,12#	20,36±1,09**
Water intake (ml/day)	46,53±2,14	41,33±2,87	32,25±1,43**	39,90±2,29	35,97±2,51*
Total weight gain (g)	31,44±3,07	50,67±6,06*	34,80±6,78	48,50±4,95*	44,44±2,87
Pos STZ or salina					
Feed consumption (g/day)	25,06±0,46	20,46±2,72	15,67±1,63**	16,69±1,23**	17,58±1,20**
Water intake (ml/day)	48,80±1,45	107,83±15,38***	67,3±9,51#	80,66±7,04*	83,67±5,96*
Total weight gain (g)	28,56±4,38	16,25±3,46	19,33±2,59	19,75±4,19	13,95±4,99
Pancreas relative weight	0,41±0,03	0,37±0,02	0,31±0,02	0,37±0,04	0,33±0,03
Adipose tissue relative weight	11,05±0,80	15,05±1,17	15,20±1,99	16,97±1,91*	13,43±1,17

The data are presented as mean ± S.E.M. (n = 6-10). *** represents P < 0.001, ** represents P < 0.01, and * represents P < 0.05 compared to the CT group. # represents P < 0.05 compared to the T2DM group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. CT, control; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; WGPF, white grape pomace flour; RGPF, red grape pomace flour; Met, metformin.

Table 3: Effect of the administration of a high-fat diet and STZ, and treatment with Met, WGPF, or RGPF on serum parameters of hepatic and damage of animals subjected to an experimental induction protocol of Type 2 Diabetes.

	CT	T2DM	T2DM+Met	T2DM+WGPF	T2DM+RGPF
Uric acid	1.25±0.08	0.77±0.21	0.50±0.18**	0.68±0.12*	0.50±0.13**
Urea	41.67±0.88	37.33±4.33	39.00±3.70	33.38±2.28	40.88±1.46
Creatinine	0.40±0.04	0.23±0.03*	0.30±0.03	0.31±0.02	0.29±0.02
Protein	5.06±0.25	5.02±0.19	4.23±0.22	4.22±0.37	4.67±0.19
AST activity	140.8±10.44	149.8±19.35	129.8±14.67	82.14±4.48**###	132.7±11.19
ALT activity	69.00±7.33	106.7±10.87*	72.67±7.45	51.56±5.02####	65.50±4.35##

The data are presented as mean ± S.E.M. (n = 4-7). *** represents $P < 0.001$, ** represents $P < 0.01$, and * represents $P < 0.05$ compared to the CT group. ### represents $P < 0.001$, ## represents $P < 0.01$, and # represents $P < 0.05$ compared to the T2DM group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CT, control; DM2, Type 2 Diabetes Mellitus; FBUB, white grape pomace flour; FBUT, red grape pomace flour; Met, Metformin. Uric acid expressed as mg/dL. Urea expressed as mg/dL. Creatinine expressed as mg/dL. Protein expressed as g/dL. AST activity expressed as U/L. ALT activity expressed as U/L.

Table 4: Effect of the administration of a high-fat diet and STZ, and treatment with Met, WGPF, or RGPF on oxidative stress parameters in the livers of animals subjected to an experimental induction protocol of Type 2 Diabetes.

	CT	T2DM	T2DM+Met	WGPF	RGPF
<i>Liver</i>					
Total thiolic contente	111,8±3,08	137,6±2,28***	139,0±2,93***	139,2±3,28***	143,9±3,13***
TBARS levels	8,10±0,66	12,13±0,69*	10,03±0,81	7,02±0,90####	7,16±0,73##
ROS levels	35,03±2,07	22,52±1,31	27,02±3,46	24,86±1,52	28,60±1,52
Nitrite levels	21,88±2,88	41,50±1,14***	37,60±1,58***	43,26±1,11***	37,49±1,32***
CAT activity	43,28±0,95	49,91±6,18	42,45±7,52	55,61±3,24	41,42±5,68
SOD activity	45,38±1,72	27,85±2,36***	29,16±2,11***	22,07±3,22***	32,88±2,03**

The data are presented as mean ± S.E.M. (n = 4-8). *** represents P < 0.001, ** represents P < 0.01, and * represents P < 0.05 compared to the CT group. #### represents P < 0.001, ## represents P < 0.01, and # represents P < 0.05 compared to the T2DM group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Total thiol content expressed as nmol TNB/mg of protein, TBARS levels expressed as nmol TBARS/mg of protein, ROS levels expressed as µmol DCF/mg of protein, nitrite levels expressed as µM nitrites/mg of protein, CAT and SOD activity expressed as U/mg of protein. CAT, catalase; CT, control; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; ROS, reactive oxygen species; WGPF, white grape pomace flour; RGPF, red grape pomace flour; Met, metformin; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

Figure 1

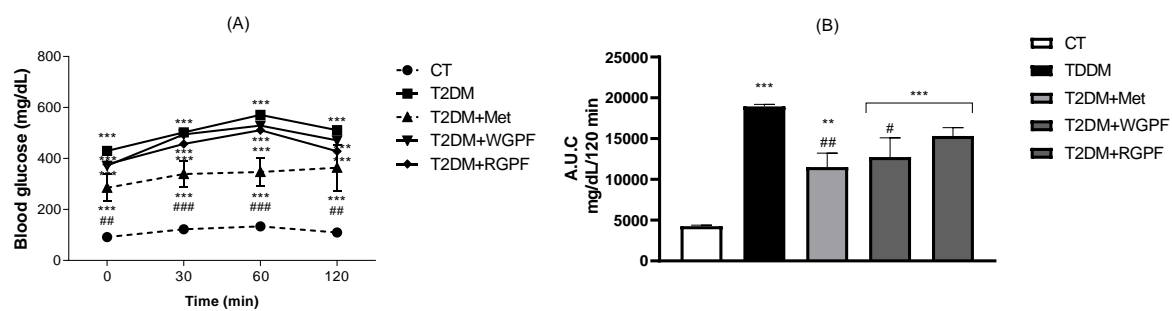


Figure 2

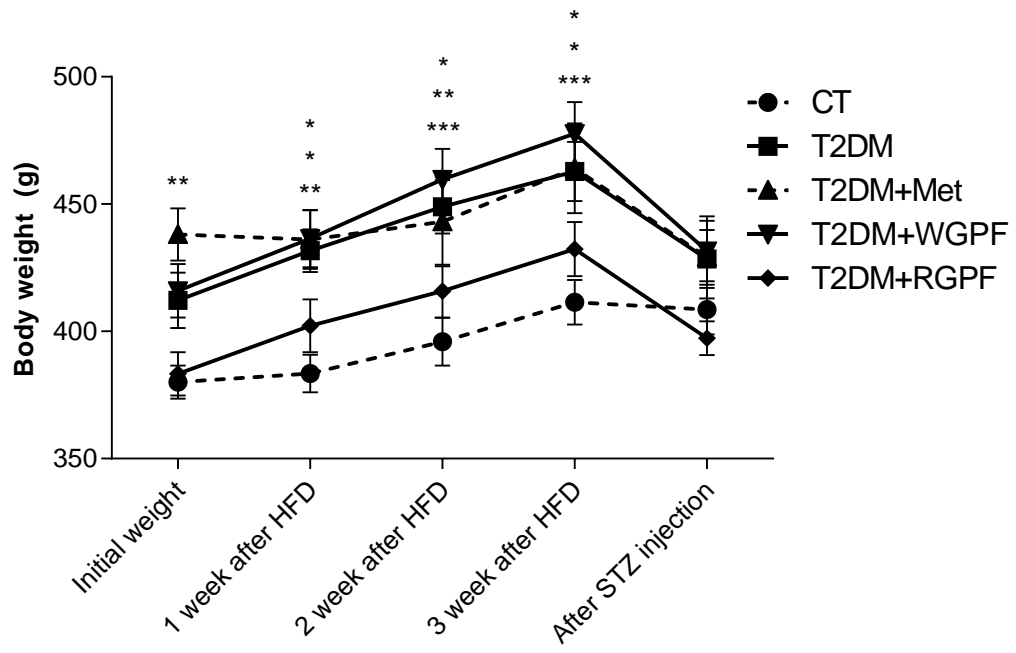


Figure 3

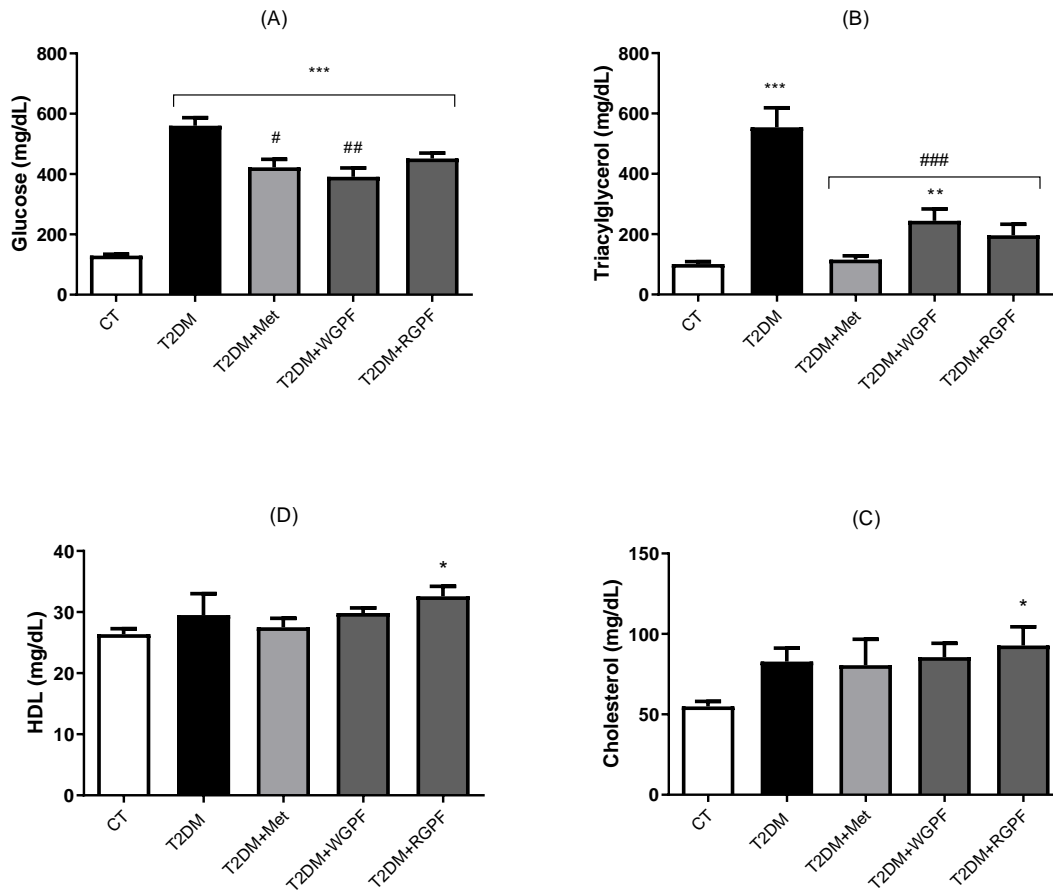


Figure 4

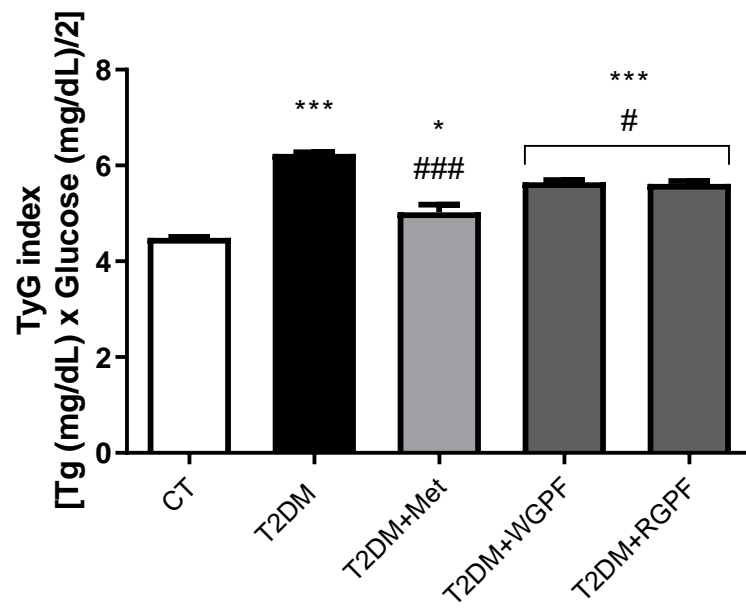


Figure 5

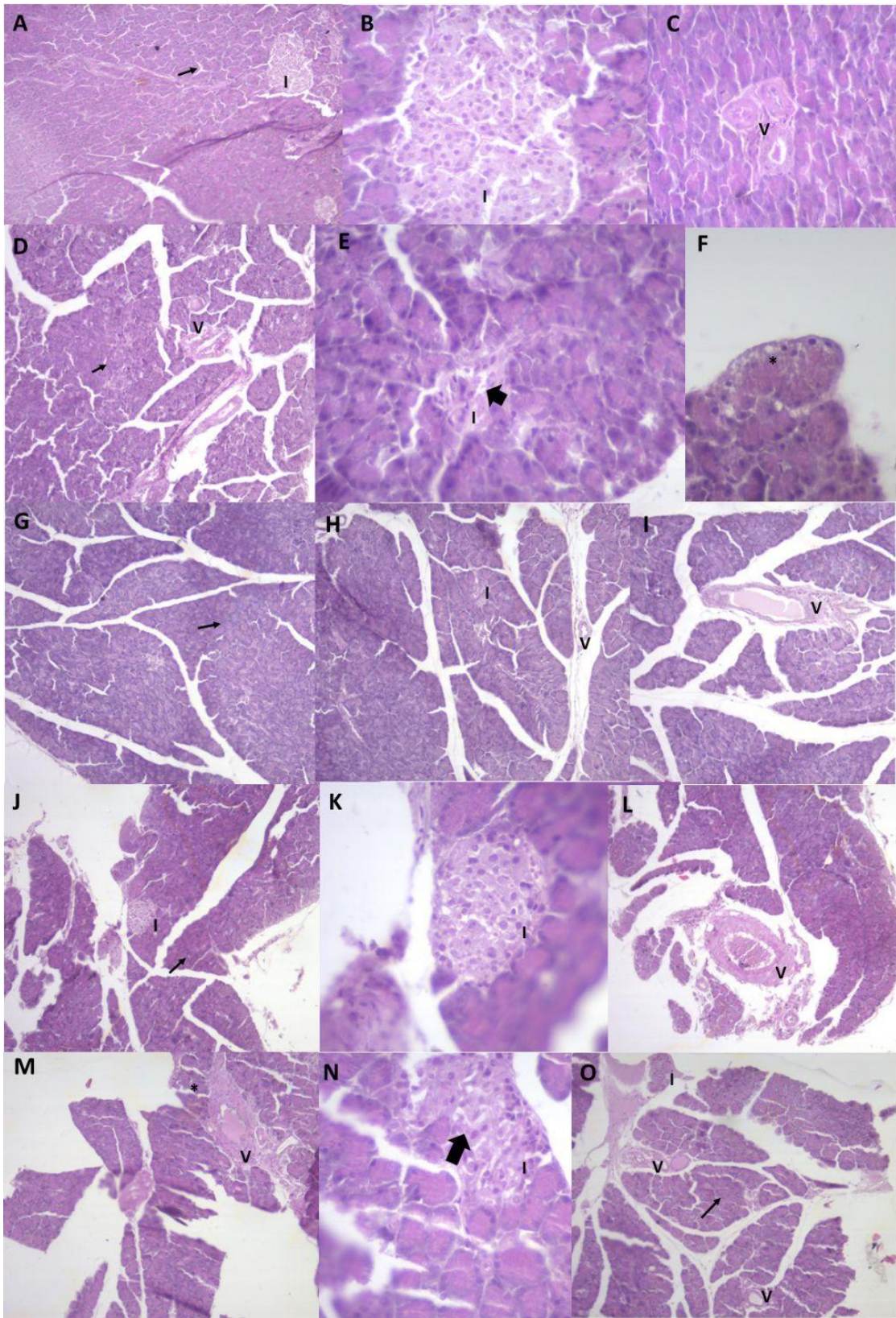


Figure 1: Oral glucose tolerance test demonstrating the variation in fasting blood glucose levels and after 30, 60, and 120 minutes of oral glucose overload (A) and the area under curve (B). The results are expressed as mean \pm S.E.M. (n=6-10). *** represents $P < 0.0001$, ** represents $P < 0.01$, and * represents $P < 0.05$ when compared to the CT group. ### represents $P < 0.001$, ## represents $P < 0.01$, and # represents $P < 0.05$ when compared to the DM2 group. Repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. A.U.C., area under the curve, CT, control; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; WGPF, white grape pomace flour, RGPF, red grape pomace flour, Met, metformin.

Figure 2: Absolute weekly weight gain over three weeks of consumption of a normolipidic diet, DHL, DHL supplemented with white grape pomace flour (WGPF), or DHL supplemented with red grape pomace flour (RGPF), and weight loss after STZ administration. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 6-10). *** represents $P < 0.001$, ** represents $P < 0.01$, and * represents $P < 0.05$ compared to the CT group. # represents $P < 0.05$ compared to the T2DM group. Repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. CT, control; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; WGPF, white grape pomace flour; RGPF, red grape pomace flour; Met, metformin.

Figure 3: Effects of treatment with Metformin and white or red grape pomace flour on serum levels of glucose (A), triglycerides (B), total cholesterol (C), and HDL cholesterol (D) in Wistar rats subjected to an experimental induction protocol of Type 2 Diabetes Mellitus. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n = 4-7). *** represents $P < 0.001$, ** represents $P < 0.01$, and * represents $P < 0.05$ compared to the CT group. ### represents $P < 0.001$, ## represents $P < 0.01$, and # represents $P < 0.05$ compared to the T2DM group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. CT, control; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; WGPF, white grape pomace flour; RGPF, red grape pomace flour; HDL, high-density lipoprotein; Met, metformin.

Figure 4: Effects of treatment with Metformin and white or red grape pomace flour on the Triglyceride to Glucose Index in Wistar rats subjected to an experimental induction protocol of Type 2 Diabetes Mellitus. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n = 4-7). *** represents $P < 0.001$, ** represents $P < 0.01$, and * represents $P < 0.05$ compared to the CT group. ### represents $P < 0.001$, ## represents $P < 0.01$, and # represents $P < 0.05$ compared to the T2DM group. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. CT, control; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; WGPF, white grape pomace flour; RGPF, red grape pomace flour; Met, metformin; TG, triglycerides; TyG, triglyceride-glucose index.

Figure 5: Pancreatic histological features of Wistar rats subjected to an experimental induction protocol of Type 2 Diabetes Mellitus treated with Metformin or white or red grape pomace flour. (A-C) CT, control; (D-F) T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; (G-H) T2DM+Met, Type 2 Diabetes Mellitus + Metformin, (J-L) T2DM+WGPF, white grape pomace flour, (M-O) T2DM+RGPF, red grape pomace flour. Thin arrows, acini with normal structure; I, Langerhans islets; V, vessels; *vacuoles in acinar cells; thick arrows, spaces in islets indicating structural changes; D, I, L, and M, congested vessels. Pancreas sections were stained with hematoxylin and eosin.