



Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja

Nasser, A.L.M.¹; Dourado, G.K.¹; Manjate, D.A.¹; Carlos, I.Z.²; Cesar, T.B.^{1*}

¹Departamento de Alimentos e Nutrição. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Recebido 25/08/2010 / Aceito 03/12/2010

RESUMO

Dois biomarcadores do estresse oxidativo foram avaliados em indivíduos saudáveis que receberam doses diárias de suco de laranja, notadamente uma fonte de vitamina C e de flavanonas, que têm sido associadas aos efeitos antioxidante, anti-inflamatório e hipolipidêmico. A capacidade antioxidante do soro sanguíneo foi avaliada através da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e a peroxidação lipídica foi avaliada pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados mostraram que após o período de suplementação com o suco de laranja houve um aumento 150% na capacidade antioxidante no soro das mulheres e 200% no soro dos homens ($p < 0,001$), mas não houve alteração na peroxidação lipídica no sangue dos voluntários. Concluindo, o aumento das reservas de flavanonas e de vitamina C, decorrente da ingestão regular de suco de laranja, melhorou expressivamente a capacidade antioxidante no sangue, sem, entretanto, apresentar efeito sobre a peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Suco de laranja. Flavonóides cítricos. Vitamina C. Atividade antioxidante. Peroxidação lipídica. Estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

O suco de laranja é conhecido por seu alto conteúdo de vitamina C, folato, potássio e flavanonas, principalmente hesperidina e naringina. Bonifácio & César (2009) destacaram que a ingestão regular de suco de laranja pode atuar positivamente para reduzir os fatores de risco para hipertensão. Garcia et al., (2008) sugeriram que o suco de laranja reduz o colesterol total e de LDL, demonstrando o potencial hipocolesterolêmico. Riso et al., (2005), Liu et al., (2000 e 2004) e Tapiero et al., (2002)

relataram que dieta rica em frutas cítricas reduz o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, prevenindo o câncer e doenças cardiovasculares devido à presença de compostos antioxidantes. Ko et al., (2005) e Haidari et al., (2009) descreveram que o suco de laranja previne o estresse oxidativo.

Atualmente, existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes dietéticos devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. Todos os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio molecular como aceptor de elétrons para uma produção eficiente de energia. Contudo, o oxigênio é um forte oxidante, tornando-se impossível impedir oxidações secundárias promovidas por essa molécula não envolvidas no metabolismo fisiológico e podendo ter consequências graves se os seus produtos não forem neutralizados por um sistema antioxidante eficiente (Sorg, 2004). As células dos organismos vivos possuem dois sistemas de defesa contra os danos produzidos pelos radicais livres, sendo o primeiro um sistema de defesa enzimático e o segundo um sistema de defesa não enzimático, constituído por antioxidantes dietéticos, como a vitamina C, vitamina E e compostos polifenólicos, dentre eles os flavonóides (Yilmaz et al., 2004).

O estresse oxidativo pode ocorrer pelo excesso de produção de radicais livres e pela sua deficiência nos mecanismos antioxidantes (Petean et al., 2007; Barreiros & David, 2006). Os peróxidos lipídicos, derivados de ácidos graxos poli insaturados, são instáveis e se decompõem para formar uma série de compostos complexos que incluem compostos carbonílicos reativos, como o malondialdeído (MDA) (Yagi, 1998; Armstrong & Browne, 1994). Estudos têm demonstrado que os níveis de MDA, frequentemente medido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), são elevados em associação com fatores de risco cardiovascular, hipertensão, hiperlipidemia e diabetes (Walter et al., 2004).

A hipótese deste estudo foi baseada nas propriedades antioxidantes do suco de laranja, notadamente uma fonte de vitamina C e de flavanonas, que exerce um efeito protetor contra o estresse oxidativo, melhorando as defesas antioxidantes em indivíduos saudáveis. Com esse objetivo, os voluntários receberam 750 mL/dia de suco de laranja

integral e pasteurizado durante oito semanas e foram mensuradas a atividade antioxidante, com o reagente 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), e a peroxidação lipídica, pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no soro sanguíneo dos voluntários antes e após a suplementação com suco de laranja.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística: homens (n=26) e mulheres (n=22) adultos e saudáveis, residentes em Araraquara (SP) e Matão (SP), com idades variando de 23 a 59 anos, foram voluntários dessa pesquisa, sendo selecionados por entrevista individual. Eles foram informados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e selecionados aqueles com disponibilidade para participar do projeto, de acordo com as normas do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), que aprovou este protocolo experimental (protocolo nº22/2009).

Desenho Experimental

Todos os voluntários ingeriram diariamente 750mL de suco de laranja (três copos), distribuídos ao longo do dia, durante oito semanas. O sangue foi colhido em duas ocasiões: no início da primeira semana do experimento e imediatamente após a oitava semana da suplementação com o suco de laranja. O nível de antioxidantes no soro foi quantificado com o método do reagente 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e a peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS. Todos os testes foram feitos em duplicata no Laboratório de Nutrição da FCFAR-UNESP.

Ensaio do DPPH

A quantificação dos níveis de antioxidantes no soro dos pacientes, antes e após a ingestão de 750 mL de suco de laranja/dia por um período de oito semanas, foi realizada segundo metodologia descrita por Chrzczanowicz et al., (2008) com modificações. O potencial antioxidante foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico utilizando-se uma solução de 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,004% em metanol (MeOH), que foi misturada à solução da amostra em análise em diferentes concentrações. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias das soluções foram determinadas em 540 nm e em espectrofotômetro Microplate Reader, Multiskan Ascent e Labsystems (EUA). A molécula radicalar DPPH apresenta absorção máxima a 540 nm e coloração violeta que se transforma em amarela quando se reduz. Essa forma reduzida corresponde à molécula do radical livre DPPH pareado com um hidrogênio do antioxidante (DPPH-H). A descoloração resultante é estequiométrica, com o número de moléculas radicalares sequestradas (Molyneux, 2004).

A desproteíntização do soro foi otimizada, realizando-se testes com acetonitrila (CH₃CN) 9,5 M em H₂O, CH₃CN 100% e metanol (CH₃OH) 100%. Ao final, foi adicionado 200 µL de CH₃CN em 200 µL de soro e a mistura foi incubada por dois minutos à temperatura ambiente e centrifugada por dez minutos, 11.000 rpm, 4°C, sendo retirado 25 µL do sobrenadante, que corresponde ao

soro desproteíntizado. A esta fração foi adicionado 970 µL de CH₃OH e 5 µL de solução de DPPH. A mistura foi agitada em vortex, colocada em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos, centrifugada por dez minutos e, então, submetida a 11.000 rpm a 4°C. 200 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para microplaca de 96 poços, sendo realizada leitura em 540 nm. A solução de referência (branco) foi constituída por 25µL de H₂O em substituição ao volume do soro sanguíneo (amostra).

Ensaio do TBARS

A quantificação dos níveis de TBARS no soro dos pacientes, antes e após a ingestão de 750 mL de suco de laranja/dia por um período de oito semanas, foi realizada segundo a metodologia de Yagi (1998) com modificações. Os lipoperóxidos do soro foram hidrolisados em meio ácido (HCl 20%) e pH 3,5. O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação lipídica e reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar o aduto MDA-TBA na proporção 1:2 com o TBA, sendo os resultados expressos em termos de TBARS. A absorbância de cada teste foi obtida em leitora de microplacas de 96 poços a 540 nm. Os níveis de TBARS no soro humano normal apresenta valores entre 1,86 e 3,94 µM.

A curva analítica foi obtida com concentrações crescentes de MDA (0; 1,25; 1,88; 2,50; 3,13; 3,75; 6,25 e 12,50 µM) em água. Foram retiradas alíquotas de 200 µL de cada solução padrão de MDA e de amostras de soro, sendo adicionado 200 µL de SDS, 500 µL do reagente de coloração (5,3 mg/mL de TBA dissolvido em ácido acético 20%, pH 3,5) e cada solução foi homogeneizada em vortex. Estas soluções foram aquecidas a 100°C por uma hora e, em seguida, colocadas em banho de gelo por 15 minutos para finalizar a reação. As soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm por dez minutos a 4°C e 200 µL do sobrenadante dos padrões e amostras de soro em microplaca de 96 poços para leitura espectrofotométrica à 540 nm. As absorbâncias obtidas para o MDA, correspondentes a cada concentração das soluções padrão, foram usadas para a construção da curva analítica, sendo determinados a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação, descritos a seguir: $Y_{MDA} = 0,0000633 + 0,00868 X$; $r = 0,9996$; $p < 0,0001$

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa Sigma Stat, versão 2.03. Foi aplicado o teste *t* de Student pareado para os marcadores do estresse oxidativo, antes e após a suplementação com o suco de laranja. A significância estatística foi de $p < 0,05$ em todas as comparações efetuadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desproteíntização do soro para o ensaio do DPPH

A otimização da metodologia para quantificação do DPPH, baseado em método descrito por Chrzczanowicz

et al., (2008), foi realizada testando diferentes solventes em diferentes concentrações para a desproteinização do soro, que é um interferente na mensuração do DPPH. A desproteinização, de acordo com a técnica original, é feita com a adição de volumes iguais de soro e CH_3CN 9,5M, o que levou, neste experimento, à formação de um precipitado branco após a adição de CH_3OH . Assim, optou-se por desproteinizar o soro utilizando-se volumes iguais de soro e dos solventes destacados a seguir: CH_3CN (9,5M), CH_3CN (100%) e CH_3OH (100%). Para o CH_3CN (9,5M), não foi detectada leitura e, com CH_3OH (100%), a leitura foi muito baixa (redução de DPPH = 0,5%), demonstrando que esses dois testes não foram eficazes para desproteinizar o soro. Entretanto, com CH_3CN (100%), foi mostrado redução de 19,70% na dosagem do DPPH, valor similar ao obtido por Chrzczanowicz et al., (2008).

Avaliação do Estresse Oxidativo

O suco de laranja é uma fonte natural de vitamina C e flavanonas, mas o efeito antioxidante desse alimento sobre os sistemas biológicos ainda não está completamente estabelecido. Estudos recentes têm sugerido que o consumo de frutas cítricas reduz o estresse oxidativo, melhora o perfil lipídico e previne contra doenças crônicas (Aviram et al., 2000; Young et al., 1999; Kurowska et al., 2000). Outros estudos têm mostrado que a vitamina C afeta positivamente o sistema imune, reduzindo o risco de inflamação (Grimble, 1997). A atividade antioxidante da vitamina C tem sido associada à proteção da função celular durante o envelhecimento, contra o dano inflamatório e o câncer (Frei, 1991; Van Popel & Van Den Berg, 1997; Block, 1991). A vitamina C parece também contribuir para a redução da aterogênese por meio da regulação da síntese de colágeno, produção de prostaciclina e óxido nítrico (Simon, 1992; Ness et al., 1996a e b).

A recomendação de vitamina C foi estabelecida com base nos estoques corpóreos, que são pequenos, mas garantem a manutenção das funções básicas no organismo, como a proteção antioxidante. Para homens e mulheres não fumantes, a recomendação é de 75 e 60mg/dia, respectivamente, de acordo com a Ingestão Dietética de Referência (DRI, 2006). A ingestão regular de fontes de vitamina C na dieta, como frutas cítricas, batata, morango, espinafre e vegetais crucíferos, é essencial para manter adequada a concentração da vitamina no plasma, entre 45 a 74 $\mu\text{mol/L}$, ao passo que pessoas mal nutridas apresentam níveis inferiores a 17 $\mu\text{mol/L}$ de vitamina C no sangue (Sánchez-Moreno, 2003). De acordo com a USDA (2007), um copo de suco de laranja de 240g (250mL) fornece 124mg de vitamina C, 7,2mg de hesperidina e 1,5mg de naringina. Assim, foi estimado que os voluntários deste estudo receberam diariamente cerca de 372mg de vitamina C, 22mg de hesperidina e 4,5mg de naringina, fornecidos pelos 750ml de suco de laranja ingeridos.

Foram avaliados no presente estudo a atividade dos compostos antioxidantes do suco da laranja – vitamina C, hesperidina e naringina – utilizando os biomarcadores do estresse oxidativo DPPH e TBARS em indivíduos adultos, saudáveis e de ambos os sexos. Os resultados mostraram diferença significativa ($p < 0,001$) entre as médias dos

períodos pré e pós-ingestão do suco de laranja, com redução do DPPH no soro dos indivíduos (Tabela 1). Tal fato mostra um aumento na capacidade antioxidante do soro dos voluntários devido, presumivelmente, à ingestão regular do suco de laranja, que pode contribuir para a prevenção ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo. Este resultado concorda com Chrzczanowicz et al (2008), que mostraram um aumento na decomposição do radical DPPH após a ingestão de frutas e hortaliças, caracterizando um aumento de compostos antioxidantes no soro de consumidores.

Tabela 1. Quantificação do TBARS e DPPH no soro de homens e mulheres antes e após o tratamento dietético com 750 mL/dia de suco de laranja durante oito semanas.

Tratamento com Suco de laranja	Homens (n=26)		Mulheres (n=22)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
TBARS (μM)	1,5 \pm 1,0	1,1 \pm 1,0	2,74 \pm 2,0	1,56 \pm 1,1
DPPH (% redução)	9,3 \pm 7,7	29,5 \pm 6,3*	9,6 \pm 5,4	22,8 \pm 8,6*

* $p < 0,05$

A peroxidação lipídica foi avaliada no soro dos voluntários por meio do teste de TBARS (Tabela 1). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as médias de MDA no soro antes e após o tratamento dietético, tanto em homens como em mulheres, o que sugere que a ingestão do suco de laranja não afetou a peroxidação lipídica no sangue. Pelo fato de todos os indivíduos avaliados, no momento da pesquisa, serem previamente saudáveis e não apresentarem infecções agudas durante o experimento, supõe-se que as defesas antioxidantes estavam em concentração suficiente para manter em equilíbrio a peroxidação lipídica nos fluidos corpóreos. Portanto, mesmo com o aumento dos compostos antioxidantes fornecidos pelo suco de laranja, não foi detectado modificação no teor de TBARS.

De forma similar, Rizo et al., (2005) não observaram alteração na concentração de TBARS quando avaliaram o consumo crônico de 600 mL/dia de suco de laranja sanguínea (*Citrus sinensis*) de coloração vermelho-escura devido à presença de antocianina. Eles também obtiveram resultados negativos para a presença de hidroperóxidos no soro e para a resistência da LDL ao estresse oxidativo. Apesar do alto teor de vitamina C introduzida com o suco de laranja vermelha (cerca de 400 mg/dia), foi observado um aumento de apenas 50% no soro, mostrando que a absorção da vitamina C não é dose-dependente para indivíduos com concentração sérica normal (Levine et al., 2001).

Concluindo, o suco de laranja consumido regularmente pelos voluntários deste estudo melhorou a capacidade antioxidante no soro sanguíneo, mas não os marcadores da peroxidação lipídica. São necessários outros estudos que avaliem períodos mais longos da ingestão do suco de laranja, que se assemelhem ao hábito regular de consumo desse alimento, ou ainda um maior número de voluntários, para que os efeitos sobre a redução da peroxidação lipídica sejam mais pronunciados e, eventualmente, significativos. Além disso, quantificar no sangue os compostos bioativos, como o ácido ascórbico e flavanonas por cromatografia líquida de alta eficiência, e outros parâmetros do estresse oxidativo, como enzimas

antioxidantes endógenas (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase), bem como quantificação de isoprostanos por cromatografia gasosa, serão objetivos a serem alcançados nos próximos estudos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Comitê de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (PADC 2009/09-I), à Fundação para Desenvolvimento das Ciências Farmacêuticas (FUNDECIF) e ao Grupo Fischer S.A. pelo suporte financeiro.

ABSTRACT

Evaluation of serum oxidative stress in regular consumers of orange juice

Two biomarkers of oxidative stress were evaluated in healthy volunteers treated with daily doses of orange juice that is well known source of vitamin C and citric flavanones, which have been associated with antioxidant, anti-inflammatory and hypolipidemic effects. The antioxidant capacity in the blood serum was evaluated by studying the scavenging of 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical, and also lipid peroxidation was evaluated by the thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) assay. The results have shown that the regular consumption of orange juice increased 150% and 200% the serum antioxidant capacity for women and men respectively, but it was no significant change in the serum lipid peroxidation. In conclusion, the increase of flavonones and vitamin C in the body due to the regular intake of orange juice expressively improved the antioxidant capacity, but without significant effect on the lipid peroxidation.

Keywords: Orange juice. Citric flavonoids. Vitamin C. Antioxidant activity. Lipid peroxidation. Oxidative stress.

REFERÊNCIAS

- Armstrong D, Browne R. The analysis of the free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol.* 1994; 366(43):58.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:1062–76.
- Barreiros ALB, David JM. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006; 29(1):113-23.
- Block G. Vitamin C and cancer prevention the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53(suppl):270S–82S.
- Bonifácio NP, Cesar TB. Influência da ingestão crônica do suco de laranja na pressão arterial e na composição corporal *Rev Bras Hipertens.* 2009; 16(2):76-81.
- Chrzczanowicz J, Gawron A, Zwolinska A, Graft J. Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46(3):342–9.
- Dietary Reference Intakes (DRI): The Essential Guide to Nutrient Requirements. Washington, DC: National Research Council, Institute of Medicine of the National Academics; 2006.
- Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(suppl): 1113S–8S.
- Garcia ACDB, Bonifácio NP, Vendramine RC, César TB. Influência do consumo de suco de laranja nos lípides sanguíneos e na composição corporal de homens normais e com dislipidemia. *Nutrire Rev Soc Bras Alim Nutr.* 2008;33(2):1-11.
- Grimble RF. Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *Int J Vitam Nutr Res.* 1997;67:312-20.
- Haidari F, Keshavarz SA, Rashidi MR, Shahi MM. Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. *J Clin Biochem Nutr.* 2009;45:285-291.
- Ko S, Choi S, Ye S, Cho B, Kim H, Chung M. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J Med Food.* 2005; 8(1):41-6.
- Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piché LA, Serratore P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:1095-100.
- Levine M, Wang Y, Katz A, Eck P, Kwon O, Chen S, Lee JH, Padayatty SJ. Ideal vitamin C intake. *Biofactors.* 2001; 15:71-4.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004; 134:3479S-85S.
- Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the women's health study. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:922-8.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol.* 2004; 26(2):211-9.
- Ness AR, Khaw KT, Bingham S, Day NE. Vitamin C status and respiratory function. *Eur J Clin Nutr.* 1996a; 50:573–9.
- Ness AR, Khaw KT, Bingham S, Day NE. Vitamin C status and serum lipids. *Eur J Clin Nutr.* 1996b; 50:724–9.
- Petean CC, Gomes FM, Rosa e Silva JC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Navarro PAAS. Peroxidação lipídica e vitamina E no soro e no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose submetidas à estimulação

- ovariana controlada. *Rev Bras Ginec Obst.* 2007; 29(6):303-9.
- Riso P, Visioli F, Gardana C, Grande S, Brusamolino A, Galvano F, Galvano G, Porrini M. Effects of blood orange Juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:941-7.
- Sánchez-Moreno C, Cano MP, Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granado F, Martín A. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(3):454-60.
- Simon JA. Vitamin C and cardiovascular disease: a review. *J Am Coll Nutr.* 1992; 11:107-25.
- Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C.R. Biologies.* 2004; 327:649-62.
- Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother.* 2002; 56:200-7.
- USDA. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. Database for the flavonoid content of selected foods. Release 2. Beltsville, Maryland: USDA; 2007. [cited 2009 Jun 9]. Available from: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>>.
- Van Popel G, Van Den Berg H. Vitamins and cancer. *Cancer Lett.* 1997; 114:195-202.
- Walter, M.F.; Jacob, R.F.; Jeffers, B.; Ghadanfar, M.M.; Preston, G.M.; Buch, J.; Mason, P. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the prevent study. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44:1996-2002.
- Yagi, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol.* 1998; 108:101-6.
- Yilmaz Y, Toledo RT. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci Technol.* 2004; 15:422-33.
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, et al. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69:87-94.

