

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Marina Chiochetta

**Avaliação do efeito do suco verde
sobre o metabolismo de indivíduos
adultos**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2017**

Marina Chiochetta

Avaliação do efeito do suco verde sobre o metabolismo de indivíduos adultos

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do
grau de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Alethéa Gatto Barschak

**Porto Alegre
2017**

Catlogação na Publicação

Chiochetta, Marina

Avaliação do efeito do suco verde no metabolismo de indivíduos adultos / Marina Chiochetta. -- 2017.

53 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2017.

Orientador(a): Alethéa Gatto Barschak.

1. Antioxidantes. 2. Estresse oxidativo. 3. Promoção da saúde. 4. Radicais livres. 5. Suco verde. I. Título.

Agradecimentos

À Prof^ª Dra. Alethéa Gatto Barschak, pela orientação, dedicação e amizade;

À colega e amiga Rafaela Alvariz pelo auxílio e pelas experiências compartilhadas;

Aos colaboradores do Laboratório de Análises Clínicas, de Dietética, de Química Analítica, da Central Analítica, da Biologia Molecular, de Genética Toxicológica e de Imunologia da UFCSPA, pela disposição e colaboração nos experimentos;

À Desiree Haddad e Maria Carolina Boeira, pela ajuda na coleta sanguínea dos voluntários;

Ao Professor Alcyr e aos estudantes de psicologia Richard Chuquel Silveira de Avila e ao Bruno Kriegler, pelo auxílio nos testes psicológicos;

À Professora Fernanda e as estudantes da nutrição Laura Neumann e Vanessa Cezimbra, pelo auxílio nos testes antropométricos e nutricionais;

Às bolsistas de Iniciação Científica, Isabel Taís e Eduarda, que me auxiliaram no planejamento e execução das atividades propostas;

Ao Nupesq (Núcleo de Pesquisa), pelo auxílio na análise de dados;

Aos voluntários, que contribuíram para a realização desse projeto de pesquisa;

Aos colegas do Laboratório Pró-Ambiente Análises Químicas e Toxicológicas, por entenderem minha ausência em diversos momentos;

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo, carinho e compreensão;

Ao Artur, pelo companheirismo, paciência e pelo amor durante essa etapa da minha vida;

Aos meus irmãos, Daniel e Gabriela, pelo apoio incondicional e por estarem sempre vibrando e torcendo por minhas conquistas;

Aos meus pais, Luiz Carlos e Dagmar, que sempre incentivaram meus estudos, pelo amor e dedicação ao longo dos anos;

E, principalmente a Deus, o grande responsável por tudo isso: tudo o que sou, toda força que eu tive, a saúde que tenho e as pessoas que colocou ao meu redor.

Sumário

1. Introdução	8
1.1. Espécies reativas	9
1.1.1 Ação de espécies reativas sobre macromoléculas	10
1.2 Balanço Redox	12
1.3. Defesas Antioxidantes	13
1.4. Estresse oxidativo e doenças crônicas	15
1.5. Referências Bibliográficas	20
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. Artigo científico redigido em inglês	25
4. Considerações finais	49
5. Anexos	50

Lista de abreviaturas utilizadas

BMI: Body Mass Index

CAT: Catalase

ER: Espécies Reativas

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

GPx: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HDL: High-Density Lipoprotein

LDH: Lactato Desidrogenase

LDL: Low-Density Lipoprotein

MAC: midarm circumference

REDOX: oxirredução

RL: radical livre

RPM: Rotações por Minuto

Scup: Styrofoam cup

SH: Sulfidrilas

SOD: Superóxido Dismutase

SV: Suco Verde

TBARS: Thiobarbituric acid-reactive Substances

TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

VLDL: Very-Low-Density Lipoprotein

Resumo:

Introdução: Frutas e verduras contêm muitos compostos com potencial atividade antioxidante. Em um estudo com ratos, o consumo de uma receita de suco verde por 15 dias sugeriu um efeito benéfico sobre o estado redox do organismo, assim como reduziu o ganho de massa corporal nesses animais em, aproximadamente, 20%.

Objetivos: Avaliar o efeito de uma receita de suco verde no metabolismo de adultos, a fim de identificar novas fontes dietéticas preventivas e novas terapias adjuvantes para a obesidade e para doenças crônico-degenerativas.

Material e Métodos: Este foi um ensaio clínico controlado randomizado unicego. O recrutamento dos voluntários com idades entre 18 e 59 anos foi por anúncios na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Suco verde (grupo experimental) ou placebo (grupo controle) foram consumidos de segunda à sexta-feira, entre 8 e 9 horas da manhã, na quantidade de 300 ml, durante 60 dias (exceto sábados e domingos). Para avaliar efeitos do suco verde no metabolismo, foram analisados: **a)** glicemia, perfil lipídico plasmático, função renal e função hepática; perfil redox; enzimas antioxidantes; conteúdo proteico; **b)** antropometria; **c)** bem-estar e ansiedade. As avaliações foram feitas antes do dia de início da suplementação, no trigésimo dia e no sexagésimo dia.

Resultados: Ao estudarmos os efeitos de uma receita de suco verde, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados.

Conclusões: Propriedades dietéticas de sucos de frutas e vegetais são uma área de significativo interesse. Junto à análise de trabalhos prévios, este estudo sugere que as pessoas que consomem essa receita de suco verde não

apresentam significativa melhora do perfil metabólico, o que não justifica a interrupção de investigações futuras, através de nova intervenção ou com outra amostra.

Palavras-chave: antioxidantes; estresse oxidativo; promoção da saúde; radicais livres; suco verde.

1. Introdução:

Nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Vários estudos epidemiológicos indicam que a alta ingestão de produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer. Esses efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante. Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides. Esses antioxidantes neutralizam radicais livres e inibem a cadeia de iniciação, ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (Podsdek, 2007; Nunez-Córdoba e Martínez-González, 2011). Além disso, os flavonoides podem agir como pró-oxidantes no trato gastrointestinal e como antioxidantes em sistemas de cultura celular (Halliwell, 2008). Segundo Silva e cols. (2010), acredita-se que fibras alimentares associadas a vitaminas, a minerais e a compostos fenólicos antioxidantes podem estar correlacionadas à redução no risco de doenças crônicas.

Foi relatado que o consumo de verduras e de frutas está inversamente associado ao risco de muitas doenças crônicas, e os fitoquímicos antioxidantes em verduras e em frutas são considerados responsáveis por esses benefícios à saúde. Os antioxidantes fitoquímicos podem ser encontrados em muitos alimentos e plantas medicinais e desempenham um importante papel na prevenção e no tratamento de doenças crônicas causadas pelo estresse oxidativo. Frequentemente, eles possuem forte capacidade antioxidante e removedora de radicais livres, assim como ação anti-inflamatória, que são fundamentais para benefícios anticancerígenos, antienvhecimento e de proteção contra doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e doenças neurodegenerativas (Zhang e cols., 2015).

As frutas e verduras contêm muitos compostos com potencial atividade antioxidante como as vitaminas C e E, carotenoides, clorofilas, e uma variedade de antioxidantes fitoquímicos como compostos fenólicos simples, glicosídeos e flavonoides (Pellegrini e cols., 2007). Os compostos fenólicos são formados no metabolismo secundário dos vegetais e possuem funções de defesa contra o ataque de pragas. Já, em humanos e animais, tem-se observado que esses compostos fenólicos são capazes de reagir com ER e de formar radicais estáveis. Esse poder de neutralização dos compostos fenólicos é devido a sua estrutura química formada por, pelo menos, um anel aromático com grupamentos hidroxilas (Giada e cols., 2006).

Polifenóis são, provavelmente, as moléculas de interesse nutricional mais investigadas (González-Aguilar e cols., 2011). Essas moléculas demonstraram vários efeitos biológicos, tais como os testados *in vitro* ou *ex vivo*. Elas podem inibir a proliferação de células cancerosas, reduzir a vascularização, proteger os neurônios contra o estresse oxidativo, estimular a vasodilatação e melhorar a secreção de insulina (Ferguson e cols., 2004; Silva e cols., 2008).

1.1 Espécies Reativas

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas (ER), é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando ocorre um aumento na sua produção, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio

entre o sistema pró-oxidante e o sistema antioxidante (Finkel e Holbrook, 2000; Schafer e Buettner, 2001), com predomínio dos oxidantes, com consequente dano. A célula, unidade da vida, é uma verdadeira usina de pró-oxidantes e de antioxidantes (Figura 1).

1.1.1 Ação de ER sobre macromoléculas

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de atuação de ERO, de ERN e de outras ER e sua função é vital para a célula (Figura 1). Além da membrana que envolve a célula, as membranas das organelas intracelulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, apresentam uma estrutura bilipídica e uma variedade de proteínas e açúcares (Barreiros e cols., 2006). O dano celular resulta basicamente de ataque de ERO e ERN sobre as macromoléculas, tais como glicídeos, DNA, proteínas e lipídeos.

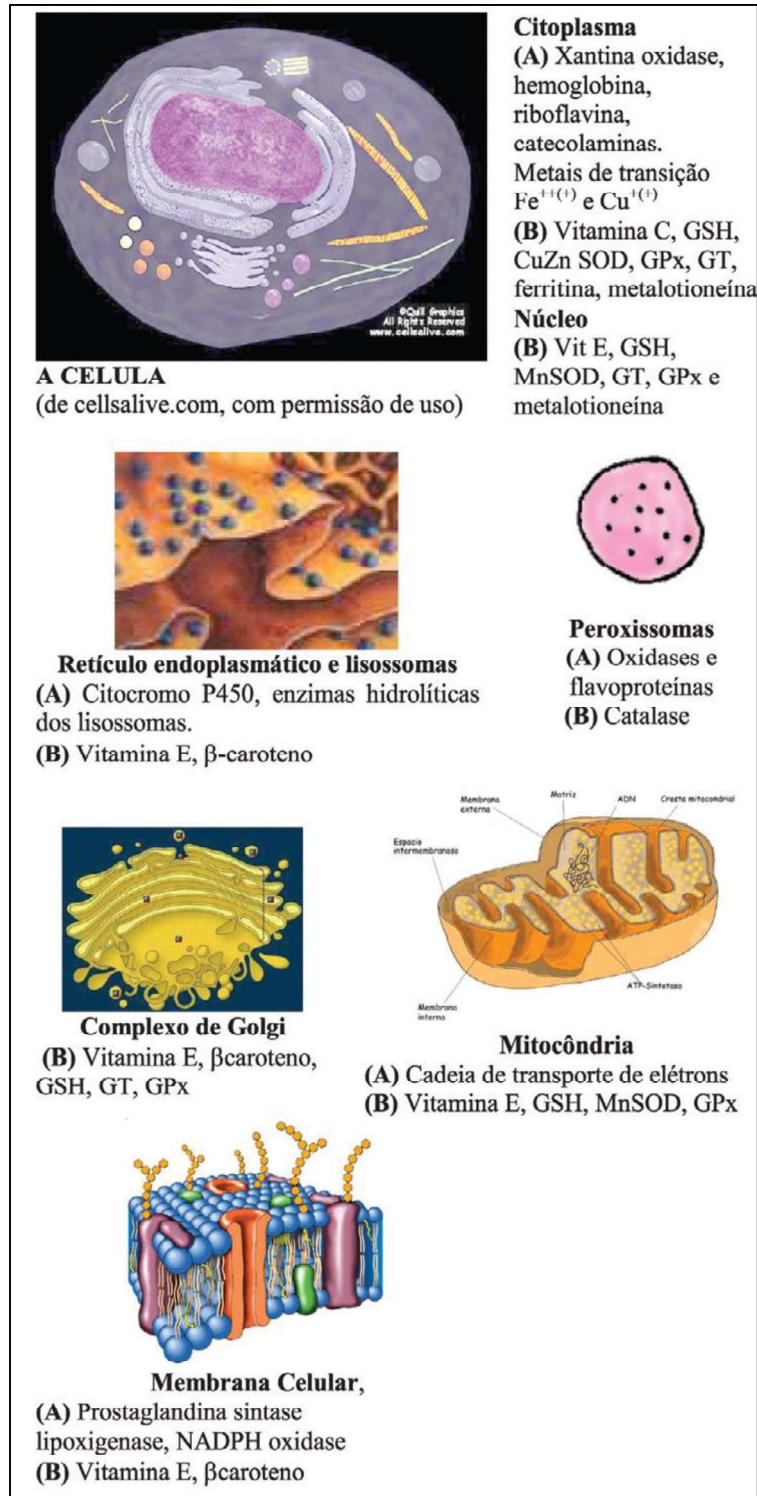


Figura 1: A célula como fonte de ER. (A) Fontes celulares de ERO, ERN e outras, por ação de várias enzimas. A capacidade de uma via específica produzir ER varia com o tipo de célula e com o dano em curso; por exemplo, na fagocitose, as NADPH oxidases da membrana de neutrófilos e macrófagos são particularmente ativadas e reduzem O_2 a O_2^- (ânion superóxido) a partir de um “burst” respiratório necessário para eliminar o agente agressor. (B) Distribuição de antioxidantes, enzimas de desintoxicação e proteínas de ligação a metais de transição que compreendem o sistema de defesa dentro das membranas e organelas celulares. Adaptado de Vasconcelos e cols., 2007.

Vinte e cinco anos atrás apontou-se que os antioxidantes só influenciariam significativamente um processo de doença se os radicais livres (RL) ou outras ER contribuíssem significativamente para a progressão da mesma (Halliwell e Gutteridge, 1984). Agora, a evidência sustenta a opinião que o aumento da formação de RL é normalmente uma consequência do dano tecidual por uma doença ou toxina (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2009). Às vezes contribui significativamente, mas frequentemente não e, em alguns casos, ERO podem estar exercendo um papel protetor, através de regulação decrescente da inflamação por exemplo (Hultqvist e cols., 2009; Halliwell, 2006; Hagenow e cols., 2009; Tang e cols., 2009; Hultqvist e cols., 2006; Zmijewski e cols., 2009). Sob tais circunstâncias, supondo que um antioxidante administrado poderia alcançar o local de formação aumentada de ERO, no melhor dos casos afeta marginalmente dano tecidual secundário e poderia até ser deletério (Halliwell e Gutteridge, 2007; Bjelakovic e cols., 2004; Bjelakovic e cols., 2008; Hultqvist e cols., 2009; Halliwell, 2006; Hagenow e cols., 2009). Às vezes pró-oxidantes podem ser mais benéficos (Tang e cols. 2009; Hultqvist e cols., 2006; Zmijewski e cols., 2009), como a ação dos flavonoides no trato gastrointestinal (Halliwell, 2008).

A maior mudança nos últimos 25 anos é a consciência pública com relação aos antioxidantes. Em 1984, apenas alguns cientistas eram conhecedores nesta área, enquanto hoje antioxidantes são citados por grande parte da mídia publicitária de alimentos e de suplementos (Gutteridge e Halliwell, 2010).

1.2 Balanço Redox

Oxidação é um ganho de oxigênio ou uma perda de elétrons, enquanto a redução é uma perda de oxigênio ou um ganho em elétrons. Os chamados "pró-

oxidantes" promovem dano oxidativo em sistemas de modelos laboratoriais enquanto os antioxidantes inibem (Gutteridge e Halliwell, 2010; Scott, 1993; Bartosz, 2003).

O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem frequentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado.

Alguns desses pares redox são interligados ("redox cycling"), outros constituem sistemas redox independentes. O balanço redox, na célula, relaciona-se à soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox, acoplados, presentes. A capacidade redutora pode ser estimada pela determinação da concentração de espécies reduzidas em um par redox e, o potencial de redução, pelo emprego da Equação de Nernst (Schafer e Buettner, 2001).

Mudanças no balanço redox de sistemas biológicos podem causar o estresse oxidativo (Schafer e Buettner, 2001). A intensidade e patogenicidade desses desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais e espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular desses processos, em que fatores de solubilidade e de difusibilidade são determinantes (Gow e Ischiropoulos, 2001).

1.3 Defesas Antioxidantes

O termo antioxidante pode ser definido de várias maneiras, dependendo dos métodos utilizados para medir a atividade antioxidante. Para refletir essa importância da metodologia, antioxidante pode ser definido como "qualquer substância que

atrasa, impede ou remove danos oxidativos a uma molécula alvo” (Halliwell e Gutteridge, 2010).

Para minimizar os danos causados a macromoléculas e tecidos, os organismos vivos fazem uso de moléculas antioxidantes que limitam o estresse oxidativo promovido pelas ER quando o nível de oxidação ultrapassa o limite aceitável. Esse mecanismo de defesa pode desintoxicar o microambiente dos agentes oxidativos antes mesmo que esses possam causar uma lesão ou mesmo bloquear a produção das ER. São essas moléculas antioxidantes que permitem ao eritrócito resistir aos ataques oxidativos, impedindo a peroxidação lipídica acelerada e outros danos celulares tais como a inativação proteica (Tedesco e cols., 2000).

O sistema antioxidante é classificado em enzimático e não-enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2); catalase, (CAT) cujo sítio ativo contém um grupo heme e atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O ; e a glutathione peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização da glutathione (GSH) como cofator (Cimen, 2008).

O sistema antioxidante não-enzimático é formado por vários compostos, com destaque para a GSH, principal substância antioxidante intracelular; para os tocoferóis (vitamina E), moléculas que exibem, qualitativamente, a atividade biológica do α -tocoferol (composto mais potente e, geralmente, a forma predominante) que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados tanto das membranas quanto das lipoproteínas; e para o ascorbato (vitamina C), molécula que atua ou, diretamente, como antioxidante sobre as ERO em ambiente biológico aquoso, impedindo a inicialização da

peroxidação lipídica e resultando na formação do ânion radical ascorbila ou, indiretamente, por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na fase lipofílica da membrana (Cimen, 2008; Vasconcelos e cols., 2007).

Existem ainda outras moléculas antioxidantes tais como o ácido úrico, o ácido tânico, o β -caroteno, além de proteínas de transporte de íons de metais de transição, como a transferrina (transporte de ferro) e a ceruloplasmina (transporte de cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina (Vasconcelos e cols., 2007)).

Esse sistema de defesa atua frente às ER, mas se torna insuficiente quando as reservas de antioxidantes estão baixas e a quantidade de ER está em excesso. No entanto, o papel exato desses componentes da dieta na manutenção da saúde e na prevenção de doenças ainda é incerto (Palafox-Carlosb e cols., 2011).

1.4 Estresse oxidativo e doenças crônicas

Um desequilíbrio entre a geração de ERO e sistemas de defesa antioxidante parece ser um fator importante em doenças crônicas como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e muitos outros devido a interrupções na síntese, reparo e manutenção do DNA, proteínas, lipídeos e outros componentes celulares afetados por ERO (Higashi e cols, 2009).

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, na transformação e na morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, a indução do câncer e a propagação da AIDS em pacientes soropositivos (HIV+), bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças autoimunes, cardiopatias, câncer, doenças do pulmão, intoxicação por xenobióticos e muitas outras (Tabela 1), (Vasconcelos e cols., 2007). Por outro lado, é também fato

reconhecido que ERO e ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, na fertilização de ovos e no amadurecimento de frutos (Vasconcelos e cols., 2007).

O reconhecimento dessa relação estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos.

O interesse de encontrar antioxidantes naturais aumentou consideravelmente desde que pesquisas mostraram o impacto que esses compostos têm na gerência de uma variedade de circunstâncias clínicas e na manutenção da saúde (Kim SY, 2012). Sucos de vegetais são uma boa fonte de muitos compostos antioxidantes biologicamente ativos (Kiefer e cols., 2004).

Guias para promoção da saúde e prevenção de doenças dos Estados Unidos e ao redor do mundo incluem recomendações para consumir uma variedade de frutas e de vegetais cada dia, pois eles fornecem quantidades significativas de nutrientes, especialmente vitaminas, açúcares, minerais e fibras (Dumbrava e cols., 2011; Slavin e Lloyd, 2012; Hyson, 2015). Evidências sugerem uma associação entre uma dieta rica em frutas e vegetais e uma melhora na saúde, bem como redução do risco de doenças crônicas graves em seres humanos (Slavin e Lloyd, 2012). Além disso, pesquisas em andamento demonstram que compostos bioativos em fontes vegetais modulam processos importantes relacionados à doença através de uma variedade de mecanismos (Liu, 2013).

Uma via alternativa para consumir quantidades apropriadas de frutas e de verduras é escolher bebidas como sucos. Nos últimos anos, a demanda por essas

Tabela 1. Doenças selecionadas, relacionadas ao estresse oxidativo

Doenças	Natureza do Envolvimento com ER
Aterosclerose, Síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Kwashiorkor, Doença de Keshan	Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes.
Doença de Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, CCl ₄ etc.	Uso de drogas e toxinas. Na doença de Parkinson as toxinas produzidas estariam envolvidas com a produção de radicais livres.
Doença de Alzheimer, Asma, Artrite reumatóide, asbestose, Síndrome de Insuficiência Respiratória do Adulto	Produção de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HClO por células fagocíticas ativadas.
Esclerose múltipla	Perturbação estrutural da célula. As hemácias tornam-se mais susceptíveis à ação dos radicais livres.
Doença granulomatosa crônica	Defeito genético no sistema antioxidante.
<i>Diabetes mellitus</i> , anoxia, injúria da reperfusão, pré-eclâmpsia	Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigênio.
Hipertensão arterial sistêmica	Produção de $O_2^{\cdot-}$ por NADPH/NADP oxidase.
Hemocromatose idiopática, talassemia, anemia falciforme, doença de Wilson	Transferência de elétrons ao oxigênio por metais de transição.
Doença granulomatosa crônica, Deficiência de enzimas antioxidantes (Acatalassemia, por exemplo)	Defeito genético no sistema antioxidante, especificamente o sistema NADPH oxidase.

Adaptado de Vasconcelos e cols., 2007.

bebidas vem aumentando em muitos países (Singh e cols., 2015). Embora seja universalmente aceito que a ingestão de frutas e de vegetais é protetora, não há um consenso claro sobre os efeitos de consumir os sucos que são extraídos deles (Ruxton e cols., 2006; Slavin e Lloyd, 2012).

É importante esclarecer que a denominação suco verde (SV) está consagrada na população como o termo utilizado, vulgarmente, para se referir a uma bebida preparada ao se liquidificar mecânica ou eletricamente algumas frutas, além de vegetais verde-escuros como a couve, a qual se encontra na grande maioria das receitas publicadas em meios de comunicação diversos. A ingestão de sucos verdes está disseminada entre a população, entretanto não há consenso quanto a sua composição. Relacionado a efeitos desintoxicantes, o seu uso vem associado ao termo “*detox*”, oriundo de uma abreviação da palavra de língua inglesa “*detoxification*”, usada como adjetivo de sucos verdes.

O SV objeto deste estudo contém frutas como maçã Gala (*Malus domestica* Borkhausen), laranja-do-céu (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e vegetais verdes como alface (*Lactuca sativa*), couve (*Brassica oleracea* – cultivar *Acephala*), repolho (*Brassica oleracea* – cultivar *Capitata*) e pepino (*Cucumis sativus*). Foi demonstrado, em um estudo com ratos, que o consumo dessa receita de SV por 15 dias diminuiu a peroxidação lipídica e a atividade da enzima antioxidante CAT, sugerindo um efeito benéfico do suco sobre o estado redox do organismo. Ainda, foi verificado que o SV reduziu o ganho de massa corporal nesses animais em aproximadamente 20%, indicando que essa suplementação poderia ter um efeito benéfico na proteção contra a obesidade (Oliveira e cols., 2013).

A patologia das inúmeras doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e hipertensão, envolve dano oxidativo em componentes

celulares. Como o estresse oxidativo e a obesidade são fatores negativos presentes na maioria dessas doenças crônicas, é possível que o SV e seus componentes, incluindo os antioxidantes, possam auxiliar no combate e/ou prevenção dessas patologias.

1.5 Referências Bibliográficas

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*. 2006;29:113-23.

Bartosz G. Total antioxidant capacity. *Adv Clin Chem*. 2003;37:219-292.

Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Glud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2004;364:1219-1228.

Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Glud C. Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28:689-703.

Cimen MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Clim Acta*. 2008;390:1-11.

Dumbravă DG, Hădărugă NG, Moldovan C, Raba DM, Popa MV, Rădoi B. Antioxidant activity of some fresh vegetables and fruits juices. *J Agroalimnt Process Technol*. 2011;17:163-8.

Ferguson PJ, Kurowska E, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick DJ. A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J Nutr*. 2004;134:1529-35.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239-47.

Giada MLR, Mancini Filho, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. *Publicatio UEPG Ciências Biológicas da Saúde*. 2006;12:7-15.

Gow AJ, Ischiropoulos HJ. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J Cell Physiol*. 2001;187:277-82.

Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393:561-564

Hagenow J, Gelderman KA, Hultqvist M, Merky P, Backlund J, Frey O, *et al*. Ncf1-associated reduced oxidative burst promotes IL-33R⁺ T Cell-mediated adjuvant-free arthritis in mice. *J Immunol*. 2009;183:874-881.

Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci*. 2006;31:509-515.

Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys*. 2008;476:107-112.

- Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:531-542.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 1984;1:1396-1397.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009;73:411-8.
- Hultqvist M, Olofsson P, Gelderman KA. A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Med.* 2006;3:e348.
- Hultqvist M, Olsson MA, Gelderman KA, Holmdahl R. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends Immunol.* 2009;30:201-208.
- Hyson DA. A review and critical analysis of the scientific literature related to 100% fruit juice and human health. *Adv Nutr.* 2015;6:37-51.
- Kiefer I, Prock P, Lawrence C, Wise J, Bieger W, Bayer P, *et al.* Supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased serum antioxidants and folate in healthy adults. *J Am Coll Nutr.* 2004;23:205-11.
- Kim SY. Comparison of Nutritional Compositions and Antioxidant Activities of Building Blocks in Shinsconcho and Kale Green Vegetable Juices. *Prev Nutr Food Sci.* 2012;17:269-73.
- Liu RH. Dietary bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci.* 2013;78:A18-25.
- Nunez-Córdoba JM, Martínez-González MA. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem.* 2011;11:1861-9.
- Oliveira PS, Saccon TD, Da Silva TM, Costa MZ, Dutra FS, De Vasconcelos A, *et al.* Green Juice as a protector against reactive species in rats. *Nutr Hosp.* 2013 Sep-Oct;28:1407-12.
- Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *J Food Sci.* 2011;76:R6-R15.
- Pellegrini N, Colombi B, Salvatore S, Brenna OV, Galaverna G, Del Rio D, *et al.* Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *J Sci Food and Agr.* 2007;87:103-11.
- Podsedek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *Lebensm Wiss Technol.* 2007;40:1-11.

Ruxton CH, Gardner E, Walker D. Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. *Int J Food Sci Nutr*. 2006;57:249-272.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol Med*. 2001;30:1191-1212.

Scott G. Autoxidation and antioxidants: historical perspectives. In: Scott G. *Atmospheric Oxidation and Antioxidants*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 1-44.

Silva AR, Pinheiro AM, Souza CS, Freitas S, Vasconcelos V, Freire SM, *et al*. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF- α and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biol Toxicol*. 2008;24:75-86.

Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Koblitz MGB. Compostos Fenólicos. Carotenoides e Atividade Antioxidante em Vegetais. *Semin: Ciênc Agrár*. 2010;31:669-82.

Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Lim S, Andrews KG, *et al*. Global, regional, and national consumption of sugar-sweetened beverages, fruit juices, and milk: A systematic assessment of beverage intake in 187 countries. *PLOS ONE*. 2015;10.

Slavin JL, Lloyd B. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr*. 2012;3:506-16.

Tang SY, Cheah IK, Wong HS, Halliwell B. Notopterygium forbesii boiss extract and its active constituent phenethyl ferulate attenuate pro-inflammatory responses to lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. A "protective" role for oxidative stress? *Chem Res Toxicol*. 2009;22:1473-1482.

Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, *et al*. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J Nutr Biochem*. 2000;11:114-9.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quim Nova*. 2007;30:1323-38.

Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP, *et al*. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Disease. *Molecules*. 2015;20:21138-56.

Zmijewski JW, Lorne E, Tsuruta Y, Zhao X, Sha Y, Liu G *et al*. Antiinflammatory effects of hydrogen peroxide in neutrophil activation and acute lung injury. *Am J Resp Crit Care Med*. 2009;15:694-704.

2. Objetivos:

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de uma receita de Suco Verde no metabolismo de adultos.

2.2 Objetivos específicos

Determinar, nos indivíduos suplementados ou não com o SV durante 9 semanas, os seguintes parâmetros:

1. Perfil lipídico plasmático através da determinação do colesterol total, da lipoproteína de alta densidade (HDL) - colesterol, da lipoproteína de baixa densidade (LDL) - colesterol, da proteína de muito baixa densidade (VLDL) - colesterol e de triacilgliceróis, antes do dia de início da suplementação, no trigésimo dia e no sexagésimo dia.
2. Glicemia antes do dia de início da suplementação, no trigésimo dia e no sexagésimo dia.
3. Parâmetros hematológicos antes do dia de início da suplementação, no trigésimo dia e no sexagésimo dia.
4. Função renal e hepática por meio da determinação plasmática de ureia, creatinina, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH), antes e depois da suplementação.
5. O efeito do SV sobre o equilíbrio redox por meio da determinação plasmática de ER de ácido tiobarbitúrico (TBARS), do conteúdo de carbonilas e sulfidrilas (SH) e da determinação em eritrócitos das enzimas SOD, CAT, antes da suplementação, no trigésimo dia e no sexagésimo dia.

6. Avaliar o estado nutricional através da aferição das medidas antropométricas de peso, estatura, circunferência abdominal e cálculo do índice de massa corporal (IMC), antes da suplementação, no trigésimo dia e no sexagésimo dia.
7. Avaliar indicadores de ansiedade, bem-estar percebido e autoeficácia antes do dia de início da suplementação e no sexagésimo dia.

3. Artigo científico redigido em inglês

A ser submetido para publicação na Revista The journal of nutrition, health & aging.

Effect of Green Juice on human metabolism: a single-blind randomized placebo-controlled clinical trial.

Marina Chiochetta¹, Eduarda Jardim Ferreira², Richard Chuquel Silveira de Avila²,
Alcyr Alves de Oliveira³, Fernanda Michielin Busnello⁴, Elizandra Braganhol⁵, Alethéa
Gatto Barschak¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

³*Programa de Pós-Graduação em Psicologia*, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição*, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵*Programa de Pós-Graduação em Biociências*, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Corresponding author**

Alethéa Gatto Barschak

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite, 245, sala 304

90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone (+55) 5133038762

Email: alethea@ufcspa.edu.br

Abstract

Objective: Fruits and vegetables contain many compounds presenting potential antioxidant activity. In a study with rats, the consumption of a green juice recipe for 15 days suggested a beneficial effect on redox state, as well as reduced weight gain in these animals by approximately 20%. The objective of this study was to evaluate the effect of a green juice recipe in adult metabolism in order to identify new preventive dietary sources and new therapies for obesity and chronic degenerative diseases. Design: This was a single-blind randomized controlled clinical trial. Setting: Recruitment and data were, respectively, made and collected at the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Participants: Fourteen of them in the juice group and thirteen controls, with the mean age of 31.07 and 30.15 respectively. Intervention: Green juice (experimental group) or placebo (control group) were consumed from Monday to Friday, between 8 and 9 am, in the amount of 300 mL, for 60 days (except Saturdays and Sundays). Measurements: To verify the effect of green juice on metabolism were evaluated: **a)** glicemia, plasma lipid profile, renal function and liver function; redox profile, antioxidant enzymes; **b)** anthropometry; **c)** well-being and anxiety. Evaluations were made before the day of starting supplementation, on the thirtieth day and the sixtieth day. Results: Our study did not show a significant difference between the treatments. Dietary properties of vegetable and fruit juices are an area of significant interest. Conclusion: Together with an analysis of previous works, we suggest that green juice did not show a metabolic function improvement and there is a need to call for further research on this issue, mainly through different intervention and other samples.

Key words: antioxidants, free radicals, health promotion, juices, oxidative stress.

Introduction:

In the last decade, preventive medicine has undergone a great advance, especially in developed countries. Research has demonstrated that nutrition plays a crucial role in the prevention of chronic disease, as most of them can be related to diet. Functional food enters the concept of considering food not only necessary for living but also as a source of mental and physical well-being, contributing to the prevention and reduction of risk factors for several diseases or enhancing certain physiological functions (1). A food can be regarded as functional if it is given to it an extra function which is often related to health improvement.

The main antioxidants in vegetables are vitamins C and E, carotenoids and phenolic compounds, especially flavonoids. These antioxidants absorb free radicals and inhibit the initiation chain or interrupt the chain of propagation of oxidative reactions promoted by radicals (2, 3). Epidemiological studies have shown a close correlation between fruit consumption and a reduction in the risk of chronic diseases. It is believed that the combination of vitamins, minerals, phenolic antioxidant compounds and fiber is responsible for the desired effect (4).

Antioxidant phytochemicals can be found in many foods and medicinal plants, and play an important role in the prevention and treatment of chronic diseases caused by oxidative stress. They often possess strong antioxidant and free radical scavenging abilities, as well as anti-inflammatory action, which are also the basis of other bioactivities and health benefits, such as anticancer, anti-aging, and protective action for cardiovascular diseases, diabetes mellitus, obesity and neurodegenerative diseases (5).

The production of reactive oxygen species (ROS), nitrogen (RNS), among other reactive species, is an integral part of human metabolism and it is observed in

several physiological conditions. ROS and RNS have important biological function, as in phagocytosis, a phenomenon in which reactive species are produced to eliminate the attacker agent. The organism has an efficient antioxidant system that is able to control and maintain the balance. However oxidative stress results from imbalance between pro and antioxidant system (6, 7), with a predominance of oxidants, presenting consequent damage.

To minimize damage to macromolecules and tissues, living organisms use antioxidant molecules that limit oxidative stress promoted by ROS when oxidation level exceeds the acceptable limit. This defense mechanism can detoxify the microenvironment of oxidative agents even before they can cause injury or block ROS production. It is these antioxidant molecules that allow erythrocyte to resist oxidative attacks, preventing accelerated lipid peroxidation and other cellular damage such as protein inactivation (8).

The antioxidant system is classified as enzymatic and non-enzymatic. The enzymatic one is represented mainly by antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the dismutation of superoxide radical anion ($O_2^{\bullet -}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2 ; catalase (CAT) whose active site contains a heme group which acts on decomposition of H_2O_2 to O_2 and H_2O ; and glutathione peroxidase (GSH-Px), which acts on peroxides in general, by use of glutathione (GSH) as cofactor (9).

The non-enzymatic antioxidant system consists of several compounds, with emphasis on GSH, the main intracellular antioxidant substance; on tocopherols (vitamin E), molecules that qualitatively exhibit the biological activity of α -tocopherol (the most potent compound and usually the predominant form) that works by blocking the propagation stage of polyunsaturated fatty acids' (from membranes and

lipoproteins) lipid peroxidation; and on ascorbate (vitamin C), a molecule that acts directly as an antioxidant on ROS in an aqueous biological environment, preventing initiation of lipid peroxidation and resulting in ascorbyl radical anion formation or indirectly by regenerating vitamin E, which acts as an antioxidant in the lipophilic phase of the membrane (9,10).

There are also other antioxidant molecules such as uric acid, tannic acid, β -carotene, as well as transition metal ion transport proteins such as transferrin (iron transport) and ceruloplasmin (copper transport and oxidation of Iron to be captured by transferrin (10).

The intake of green juices is widespread among the population, however there is no consensus as to its composition. The Green Juices have aroused great interest of the researchers, because its components present different functional properties assisting the immune system and reducing the action of ER that lead to the appearance of several diseases.

Green juice, object of this study, contains fruits such as apple Gala, orange and green vegetables such as lettuce, cabbage and cucumber (*Cucumis sativus*). It has been demonstrated in a study with rats that the consumption of this green juice recipe for 15 days decreased the lipid peroxidation and the activity of the antioxidant enzyme CAT, suggesting a beneficial effect of the juice on the redox state of the organism. Furthermore, it was found that green juice reduced weight gain in these animals by approximately 20%, indicating that this supplementation could have a beneficial effect on protection against obesity (11).

The aim of this study was to verify the effect of green juice on human metabolism, through the evaluation of biochemical parameters, redox profile, BMI (Body Mass Index) and well-being.

Methods

Population

The investigated sample was composed of individuals from the academic community of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). The target population consists of healthy adults of both sexes aged between 18 and 59 years. Smokers, holders of a pathology, anyone making use of any dietary as well as vitamin and/or mineral supplement, individuals who have any kind of allergy or intolerance to juice components and/or placebo were excluded. Informed consent was previously applied to the volunteers. The present study was approved by UFCSPA's Ethics Committee (Protocol Number 1.074.266).

Study design

This study was characterized as a single-blind randomized controlled trial. Individuals were subjected to supplementation with a recipe of fruits-and-vegetables juice (supplemented group) or an artificial green beverage of powdered gelatin and powdered drink mixes (control group, placebo).

Procedures

The selected individuals were divided into two groups: a) control group (placebo): individuals who received gelatin juice (300 ml / day); b) supplemented group: individuals who received the green juice (300 ml / day). The administration of gelatin juice (control group) or green juice (supplemented group) was held for 9 weeks from Monday to Friday, from 8 to 9 AM. Individuals were subjected to measurement and assessment at three times: before the day of starting supplementation, on the thirtieth day and on the sixtieth day.

Subjects

Forty-four volunteers were recruited as the target population the study. Nine of them (20,45%) declined to participate. A total of thirty-five agreed to participate in the study. Eighteen individuals were included in supplemented group (two of them were withdrew voluntarily and two were excluded as outliers) and seventeen in control group (three of them were withdrew voluntarily and one was excluded for changing diet along the study). At the end of the study, fourteen individuals remain in the supplemented group and thirteen in the placebo one (see Fig. 1 for the participation flow chart).

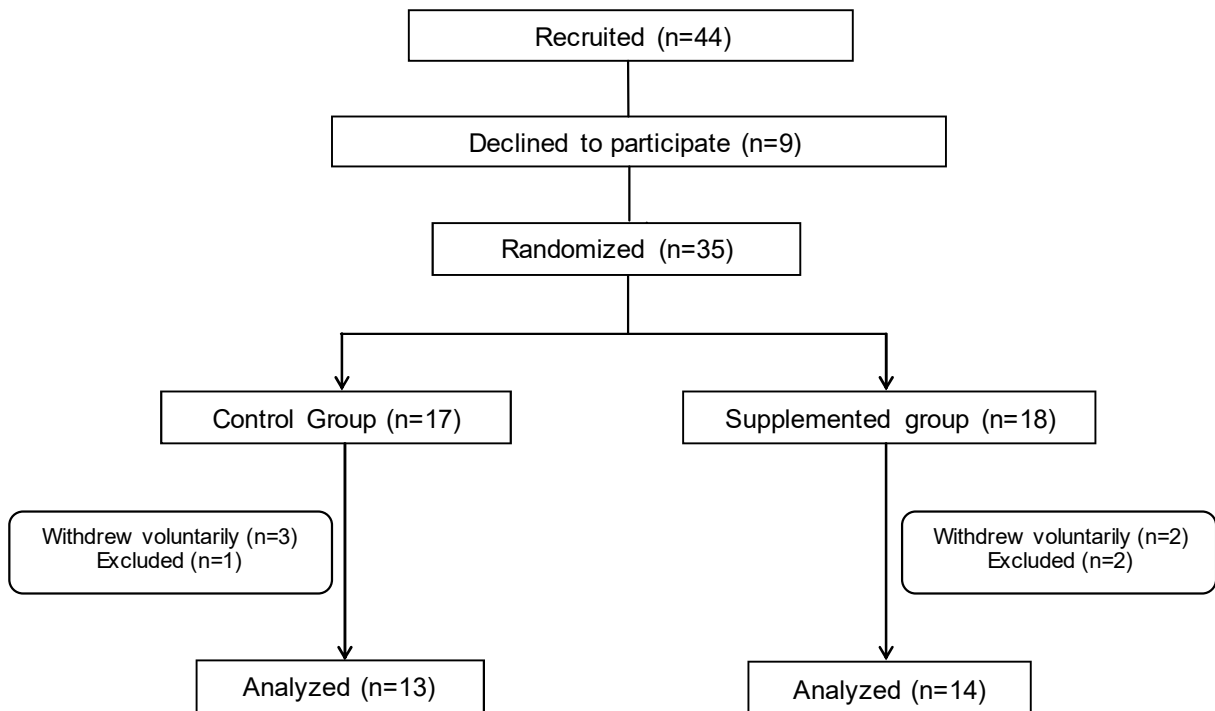


Fig 1. Participant flow chart during the study, from enrolment to completion.

Juice Preparation

Green juice was prepared using the following components: Gala apple (*Malus domestica Borkhausen*), orange (*Citrus sinensis (L.) Osbeck*) and green vegetables such as lettuce (*Lactuca sativa*), green cabbage (*Brassica oleracea* – cultivar

Acephala), head cabbage (*Brassica oleracea* – cultivar Capitata) and cucumber (*Cucumis sativus*). All components were commercially obtained in Porto Alegre, RS, Brazil. The preparation of green juice consisted of processing one apple, one lettuce leaf, one green cabbage leaf, one head cabbage leaf and the third part of one cucumber with 500 ml of water and the strained juice of one orange; and then straining to separate the solid parts. Thereafter, 300 ml were withdrawn and poured in a Styrofoam cup (scup) to be offered to the volunteers. Green juice was prepared in the Dietary Technique and Gastronomy Laboratory of UFCSPA daily.

Placebo

It was a drink made by adding one package of the Clight® refreshment powder of pineapple and mint flavor, one package of the Clight® refreshment powder of pineapple and ginger flavor and one package of the Magro® gelatin powder of lemon flavor to two liters of water. Thereon, 300 ml were withdrawn and served in a scup to be offered to the volunteers. It was prepared in the Dietary Laboratory of UFCSPA daily.

Blood collection

Volunteers had to be abstained from eating for 12 hours before blood collection.

Blood was collected through venous puncture in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) tubes or tubes without anticoagulant. Material was subjected to centrifugation for 10 minutes at 3,000 rpm; plasma or serum were separated and freezed at -80°C. Erythrocytes were washed three times in a double-volume NaCl 0.9% solution, and subjected to centrifugation for 10 minutes at 3,000

rpm after each washing. Obtained erythrocytes were diluted in water at the proportion of 1:10, frozen and stored at a -80°C freezer.

Biochemical determinations

Biochemical profile evaluation: total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triacylglycerols, glucose, urea, creatinine, proteins, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) plasmatic levels were measured according to the user's manual of each commercial kit (Bioclin / Quibasa © 2012).

Redox profile determination

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS): TBARS, a measure of lipid peroxidation, was determined on plasma sample which was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm and reported as nmol TBARS/mg of protein (12).

Carbonyls: Carbonyls content were determined spectrophotometrically (13). The damage measure was taken from absorbance reading at 370 nm. Results were reported as nmol of carbonyl groups/mg of protein.

Sulfhydryls (SH): This method is based on the 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) reduction by thiols that produces a yellow solution, thionitrobenzoate (TNB),

which absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm (14). Results were reported as nmol TNB/mg of protein.

Antioxidant Enzymes

CAT assay: activity was assayed in erythrocytes according to Aebi (15), based on the decomposition of H₂O₂ monitored spectrophotometrically at 240 nm, at ambient temperature. One CAT unity is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is reported as units/mg of protein.

SOD assay: SOD activity was measured spectrophotometrically at 480nm to Misra and Fridovich (16). This method is based on the inhibition of adrenaline autoxidation in alkaline medium by the enzyme. Results are reported as units/mg of protein.

Protein determination

Protein was determined spectrophotometrically at 650nm by the Lowry e cols (17) using bovine serum albumin as standard.

Body Composition Evaluation

Nutritional status of the individuals was assessed by measuring weight (kg), height (m), waist circumference (WC) and BMI. Weight was measured by a Welmy calibrated digital scale, which has a range of up to 200 kg. Individuals were standing erect, still, at the center of the weight scale, shoes off, wearing light clothes, head up and staring at a fixed point at eye level, to have their weight measured. Weight was measured in a reserved room. Stadiometer range is of up to 2.0 m. BMI was

calculated by the ratio between total body mass (kg) and squared height (m²) (18). WC was measured by inelastic and inextensible tape measure during individuals' standing position. Measurements were taken at minimal inspiration, surrounding the abdominal region, in the midpoint between the iliac crest and the last rib (19).

Food Consumption

Food consumption was assessed through a food survey. The 24-hour dietary recall (20) was used throughout the study period, which was nine weeks. Energy, carbohydrate, protein, fat and fiber were measured as nutritional parameters. These reminders were held three times throughout the study period: in the first, in the fifth and in the ninth weeks; always in the same week day.

Indicators of well-being and anxiety

The aim of this survey was to evaluate indicators of anxiety, life satisfaction and self-efficacy before and after a period of green juice use as dietary supplementation.

The two groups received treatment for 9 weeks and underwent two assessments with the following instruments: Beck Anxiety Inventory (BAI) and General Self-Efficacy Scale (GSE). Tests were adapted and validated for Brazilians (21 – 22). The instruments were answered by the participants before the start of the supplementation period and at the end.

Statistical analysis

The results obtained in this study were analyzed through the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) program. The normality of data was analyzed by

Shapiro-Wilk test. The analysis of quantitative variables that present normal distribution was performed through repeated measures ANOVA. Post hoc Bonferroni test was used as necessary. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

This study includes 14 subjects in the experimental group (juice group) and 13 subjects in the control group (placebo group), with mean ages of 31.07 years and 30.15 years respectively. Demographic details of the individuals by group randomization are shown in Table 1. No strong differences were found between the two groups.

Table 1: Sample characterization

	Juice Group (n=14)	Control Group (n=13)	<i>p</i>
Gender females , n (%) *	11/14 (78.6)	11/13 (84.6)	1.00
Age , years mean \pm SD**	31.07 \pm 11.09	30.15 \pm 8.52	0.81
BMI , kg/m ² mean \pm SD**	25.41 \pm 4.11	23.5 \pm 2.85	0.17

Data expressed as mean \pm standard deviation.

*Chi-square tests; **Independent t-test;

There was no difference in diet composition (carbohydrates, lipids, proteins and fiber) between groups. Data not show.

There were no significant effects on anthropometric measures between groups (Table 2).

Table 2: Anthropometric Outcomes

	Juice Group			Control Group			<i>p</i>
	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd	
Weight (kg)	70.77 ± 14.16	65.88 ± 23.59	70.21 ± 14.33	64.62 ± 10.43	64.13 ± 10.17	64.36 ± 10.65	0.406
BMI (kg/m ²)	25.41 ± 4.11	23.12 ± 7.72	24.99 ± 4.21	23.46 ± 2.85	23.23 ± 2.73	22.99 ± 2.67	0.333
WC (cm)	82.26 ± 11.54	78.03 ± 24.95	83.17 ± 11.94	81.57 ± 10.28	81.75 ± 8.50	79.40 ± 8.66	0.357

Data expressed as mean ± standard deviation (SD).

BMI: Body Mass Index.

WC: Waist Circumference.

Markers of biochemical functions are shown in Table 3. We found no significant differences on biochemical outcomes between groups.

Oxidative stress markers (Carbonyl, SH and TBARS) and antioxidants enzymes (SOD and CAT) are show in Table 4. No significant differences were found between groups.

No significant differences were found in quality of life and well-being between groups (Table 5).

Table 3: Biochemical Outcomes

	Juice Group			Control Group			p
	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd	
Glucose (mg/ml)	92.9 ± 10.5	91.9 ± 10.3	89.9 ± 11.5	91.0 ± 6.2	92.9 ± 6.4	90.5 ± 7.3	0.532
Triglycerides (mg/dl)	119.9 ± 47.2	103.3 ± 36.2	106.9 ± 49.1	119.6 ± 65.5	106.5 ± 62.4	113.1 ± 57.9	0.875
Cholesterol (mg/dl)	191.3 ± 32.5	191.0 ± 30.8	185.4 ± 34.7	184.1 ± 26.1	196.6 ± 36.4	192.5 ± 30.9	0.052
HDL (mg/dl)	65.2 ± 15.2	67.1 ± 14.3	65.1 ± 13.2	63.5 ± 12.4	68.8 ± 15.8	66.8 ± 16.6	0.389
LDL (mg/dl)	102.2 ± 34.4	103.2 ± 28.6	98.9 ± 34.0	96.7 ± 22.0	106.5 ± 29.3	103.1 ± 23.3	0.130
Urea (mg/dl)	33.5 ± 12.2	29.9 ± 8.7	31.0 ± 4.7	29.2 ± 8.1	27.5 ± 5.9	26.5 ± 11.6	0.818
Creatinine (mg/dl)	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.782
Uric Acid (mg/dl)	4.8 ± 1.0	4.5 ± 1.0	4.1 ± 0.8	4.8 ± 1.1	4.4 ± 1.2	4.3 ± 1.2	0.582
AST (U/l)	19.4 ± 4.5	20.8 ± 4.8	23.1 ± 6.0	19.9 ± 5.1	20.0 ± 3.8	20.8 ± 3.7	0.250
ALT (U/l)	7.6 ± 3.4	9.9 ± 4.6	12.7 ± 5.6	8.5 ± 7.9	10.3 ± 8.0	11.3 ± 9.3	0.303
LDH (U/l)	193.1 ± 48.0	217.6 ± 34.5	231.2 ± 38.7	225.0 ± 31.5	224.23 ± 51.1	233.1 ± 32.9	0.054
Iron (mcg/dl)	56.2 ± 40.2	57.1 ± 33.5	62.0 ± 18.3	58.1 ± 27.1	82.0 ± 59.9	76.5 ± 24.9	0.434
Total protein (g/dl)	6.9 ± 0.5	6.9 ± 0.4	6.7 ± 0.3	6.7 ± 0.4	6.8 ± 0.8	6.6 ± 0.3	0.837

Data expressed as mean ± standard deviation (SD).

HDL: high-density lipoprotein; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; LDH: lactate aminotransferase; LDL: low-density lipoprotein.

Table 4: Oxidative Stress Outcomes

	Juice Group			Control Group			p
	1 st	2 nd	3 rd	1 st	2 nd	3 rd	
Carbonyl (nmol/mg protein)	0.46 ± 0.09	0.43 ± 0.09	0.43 ± 0.08	0.48 ± 0.08	0.44 ± 0.09	0.41 ± 0.08	0.515
SH (nmol TNB/mg protein)	0.67 ± 0.52	0.66 ± 0.50	1.00 ± 1.08	1.21 ± 0.71	1.12 ± 0.80	1.25 ± 0.62	0.523
SOD (units/mg protein)	3246.55 ± 543.46	3285.67 ± 550.38	3146.63 ± 652.06	3041.54 ± 888.53	2984.83 ± 763.19	2780.45 ± 612.88	0.757
TBARS (TBARS/mg protein)	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.06	0.379
CAT (U/mg protein)	290.42 ± 69.13	294.45 ± 46.80	300.91 ± 59.74	313.61 ± 88.53	280.69 ± 110.26	277.17 ± 78.50	0.226

Date expressed mean ± standard deviation (SD).

SH: sulfhydryls; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid-reactive species; CAT: catalase

Table 5: Psychological Outcomes

	Juice Group		Control Group		<i>p</i>
	Pre-intervention	Post-intervention	Pre-intervention	Post-intervention	
BAI	7.86 ± 4.22	9.07 ± 6.33	3.92 ± 3.04	4.46 ± 4.39	0.660
GSE	54.29 ± 22.76	53.21 ± 33.09	55.38 ± 29.47	54.62 ± 30.65	0.970

Date expressed mean ± standard deviation (SD).

BAI: Beck Anxiety Inventory

GSE: General Self-Efficacy Scale

Discussion

Fruits and vegetables, apart from being good sources of vitamins, minerals, and fiber, are also rich sources of potentially bioactive compounds known as phytochemicals. These compounds are not considered as nutrients, but much of disease prevention potential of fruits and vegetables in human health is thought to be provided by these compounds (23 - 25). However, there are many unanswered questions related to fruit juice and health in humans. In this context, this study aimed to investigate the effect of green juice (which combines fruits and vegetables) on human metabolism, considering biochemical and redox profile, as well as on well-being.

Green juice has been popularly consumed as a health supplement, but there are few studies demonstrating its beneficial effect on human metabolism. In the volunteers of our study, green juice supplementation did not modify plasma biochemical parameters such as glucose and lipid profile. However, a 10% reduction can be observed on tryglicerides levels in green juice group. In a recent study, increasing fruit and vegetable intake did not alter plasma glucose or lipid status in participants, despite significantly increasing circulant folate levels (26). It is notable that a number of studies did not find an association between fruit juice and adverse

outcomes related to bodyweight, plasma lipids or blood glucose in adults or children (27).

Our results also did not show any significant changes in the redox profile (lipid peroxidation and proteins oxidation). However, a trend of higher levels of sulfhydryl has been observed, suggesting that green juice may contribute to an increase in plasma antioxidant content. It is possible that phenolic compounds such as flavonoids are present and contribute to this trend (28 - 29). On the other hand, it is possible that we did not observe significant results due to a supplementation period of only 9 weeks.

Furthermore, our study together with other studies suggest that fruit and vegetable intake increases beneficial nutrients in healthy adults without inducing a subsequent change in antioxidant capacity or in oxidative stress markers. Interestingly, an improvement on redox balance was not accompanied to a decrease in cardiovascular risk markers, which demonstrates that high consumption of fresh squeezed carrot juice without lifestyle modifications is not sufficient to improve lipid profiles (30).

Most studies evaluating the effect of dietary supplementation had limited sample sizes of varied gender and ethnicity, in addition to short treatment periods and focus on early biomarkers rather than functional endpoints, which are costly but more meaningful. Investigations included single-dose tests, five-day studies, four-to-eight-week studies (most common), and only very rarely, studies of more than a few months of duration. There are few studies controlled for variability in background diet and other confounding variables (26 - 27).

Additional challenges to dietary supplementation researches included determining accurate dietary intake and compliance with the study protocol. In our study, we did not interfere with nutrient intake. Therefore, we had recommended that

volunteers keep their regular diets throughout the study. Thus, it was necessary to exclude a participant who modified their regular diet during the period of supplementation. Besides, differing methods of preparing juices, the variable nutrient and phytochemical content between varieties, regions, and storage conditions are inherent issues associated with the field. Furthermore, determining an appropriate dose of juice to study is a challenge; volumes ranged from 30 mL/d to 1 L in the studies reviewed. Many investigations raised important questions regarding the bioavailability and in vivo metabolism of phytochemicals in juice as well as the required exposure time and concentrations needed to be effective (27).

In present study, the sample was composed by healthy volunteers and this can be one factor contributing to no differences observed. The implications of baseline health status are uncertain. Some authors (26, 31) observed a greater response in populations deemed less healthy but apparently more likely to benefit from dietary treatment. Recent investigations have involved “at risk” subjects, but traditionally most work has focused on healthy young adults who might be more “resistant” to treatment effects. The incorporation of subjects with existing disease or risk factors introduces variability into a study but is important given the increasing risk profile of the population (27).

It is extremely important to say that there may be an evidence of actual benefits on human metabolism in different future studies. There is a clear need for larger, well-controlled studies of longer duration with well-defined outcomes. We strongly recommend future works on different samples, such as adults with chronic medical conditions. It is not all individuals who are healthy that are on a fruit-and-vegetable juice based diet. However, healthy people who consume fruits and vegetables as a dietary drink are expected to be protecting themselves from chronic diseases, due to fibers and antioxidant substances enhancement. Our sample was characterized by

healthy people. They were not asked to follow any further dietary counselling. This sample characteristic may receive different interventions such as other fruits-and-vegetables juicy blends in future researches.

The bioaccessibility and bioavailability of each antioxidant differs greatly, and the most abundant antioxidants in ingested fruit are not necessarily those leading to the highest concentrations of active metabolites in target tissues (32). Several factors interfere with the bioavailability of antioxidants, such as food source and chemical interactions with other phytochemicals and biomolecules present in the food (33). The absence of significance may be a key to unravel some doubts concerning bioaccessibility and bioavailability of antioxidants in fruits-and-vegetables drinks.

Acknowledgements

We would also like to thank the volunteers who participated in the study and those who helped in the execution of the project.

Conflict of Interest Disclosures

The authors do not have any conflicts of interest.

References

1. López-Varela S, González-Gross M, Marcos A (2002) Functional foods and the immune system: A review. *Eur J Clin Nutr* 56:S29-33
2. Podsedek, A (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *Lebensm Wiss Technol* 40:1-11

3. Nunez-Córdoba JM, Martínez-González MA (2011) Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem* 11:1861-69
4. Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Koblitz MGB (2010) Compostos Fenólicos. Carotenoides e Atividade Antioxidante em Vegetais. *Semina: Ciências Agrárias* 31(3):669-82
5. Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP et al (2015) Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Disease. *Molecules* 20:21138-56
6. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-47
7. Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol Med* 30:1191-1212
8. Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, et al (2000) Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J Nutr Biochem* 11,114–9
9. Cimen MYB (2008) Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Clim Acta* 390:1-11

10. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT (2007) Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Danos Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. *Quim Nova* 30:1323-38
11. Oliveira PS, Saccon TD, Da Silva TM, Costa MZ, Dutra FS, De Vasconcelos A, Lencina CL, Stefanello FM, Barschak AG (2013) Green Juice as a protector against reactive species in rats. *Nutr Hosp* 28:1407-12
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-8
13. Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-63
14. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-5
15. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6
16. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-75

17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1995) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
18. Borges CF, Busnello FM, Pellanda LC (2012) Identificação de Fatores de Risco Cardiovascular em Pais/Cuidadores de Crianças Cardiopatas. *Arq Bras Cardiol* 99:936-43
19. Jansen I, Katzmarzyk PT, Ross R (2002) Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current National Institutes of Health guidelines. *Arch Intern Med* 162:2074-9
20. Fisberg RM, Slater B, Marchioni DML, Martini LA (2005) *Inquéritos Alimentares – Métodos e Bases Científicos*. Manole, São Paulo
21. Cunha JÁ (2001) *Manual da versão em português das Escalas Beck*. Casa do Psicólogo, São Paulo
22. Hutz CS (2014) *Avaliação em Psicologia Positiva*. Artmed, Porto Alegre
23. Denny A, Buttriss J (2007) *Plant foods and health: focus on plant bioactives*. European Food Information Resource (EuroFIR) Consortium. Funded under the EU 6th Framework Food Quality and Safety Thematic Priority; Contract FOOD-CT-2005-513944

24. Del Rio D, Costa LG, Lean MEJ, Crozier A (2009) Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20:1-6
25. Gonzalez-Aguilar GA, Ayala-Zavala JF, De la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E (2010) Phytochemical changes in the postharvest and minimal processing of fresh fruits and vegetables. In: De la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA, editors. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, 1st edn. Wiley, New York, pp 309-11
26. Duthie SJ, Duthie GG, Russell WR, Kyle JAM, Macdiarmid JI, Rungapamestry V, Stephen S, Megias-Baeza C, Kanieswska JJ, Shaw L, Milne L, Bremner D, Ross K, Morrice P, Pirie LP, Horgan G, Bestwick CS (2017) Effect of increasing fruit and vegetable intake by dietary intervention on nutritional biomarkers and attitudes to dietary change: a randomized trial. *Eur J Nutr*. doi: 10.1007/s00394-017-1469-0
27. Hyson DA (2015) A review and critical analysis of the scientific literature related to 100% fruit juice and human health. *Adv Nutr* 6:37-51
28. Hyson DA (2011) A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Adv Nutr* 2:408-20
29. Deng GF, Shen C, Xu XR, Kuang RD, Guo YJ, Zeng LS, Gao LL, Lin X, Xie JF, Xia EQ, Li S, Wu S, Chen F, Ling WH, Li HB (2012) Potential of fruits wastes as natural resources of bioactive compounds. *Int J Mol Sci* 13:8308-23

30. Potter AS, Foroudi S, Stamatikos A, Patil BS, Deyhim F (2011) Drinking carrot juice increases total antioxidant status and decreases lipid peroxidation in adults. *Nutr J* 10:96
31. Durga J, Bots ML, Schouten EG et al (2005) Low concentrations of folate not hyperhomocysteinemia are associated with carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis* 179:285-292
32. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. In: Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230s-242s
33. Parada J, Aguilera JM (2007) Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* 72:R21-R32

4. Considerações finais

Não houve diferença significativa entre o grupo experimental e o grupo controle. Tais resultados sugerem que a ingestão da receita de SV usada neste estudo não afetou: o perfil bioquímico; o perfil redox e antioxidante; as medidas de composição corporal; e indicadores de bem-estar e qualidade de vida.

Alguns autores observaram uma resposta maior em populações consideradas menos saudáveis, mas, aparentemente, mais suscetíveis a efeitos benéficos advindos de tratamentos dietéticos. Investigações recentes envolveram sujeitos “em risco”, porém, tradicionalmente, a maioria dos trabalhos tem focado em adultos jovens saudáveis que podem ser mais “resistentes” aos efeitos do tratamento (Hyson, 2015). Dessa forma, pelo fato de todos os indivíduos avaliados, no momento da pesquisa, serem previamente saudáveis e não apresentarem doenças crônicas durante o experimento sugerimos que essa pode ter sido uma limitação do estudo.

São necessários outros estudos que avaliem períodos mais longos de ingestão de bebidas feitas de vegetais como os que compuseram a receita de SV deste trabalho. Sugerimos, também, outros estudos com a mesma intervenção, porém com um número maior de voluntários, ou com uma amostra de pessoas com alguma doença crônica. Essas alternativas são para possibilitarem efeitos mais pronunciados e, eventualmente, significativos.

Mesmo diante dos resultados obtidos, que não sugerem evidências convincentes a respeito da utilização dessa receita de SV, permanecemos interessados na busca de variáveis significativas que possam atrair para um número ainda maior de pessoas a ingestão de sucos de frutas e de verduras como alternativa ao consumo de nutrientes dietéticos.

5. Anexos

Anexo I. Questionário de Avaliação

FICHA DE DADOS

1. Nome completo:

2. Curso:

3. Endereço:

4. Telefones:

5. Email:

6. Data de nascimento: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

7. Idade:

8. Sexo: () masc. () fem.

9. Apresenta doenças já diagnosticadas?

Diabete melito () não () sim

Hipotireoidismo () não () sim

Hipertireoidismo () não () sim

Hipertensão arterial sistêmica (HAS) () não () sim

Acidente vascular cerebral (AVC) () não () sim

Cardiopatia isquêmica () não () sim

Insuficiência cardíaca () não () sim

Insuficiência hepática () não () sim

Insuficiência renal () não () sim

Outras: _____

10. Está usando medicamento? () não

() sim; Qual? _____

11. Está usando algum tipo de suplemento? () não

() sim; Qual? _____

12. Possui algum tipo de alergia? () não

() sim; Qual? _____

13. Consome bebidas alcoólicas? () não

() sim; Qual frequência? _____

14. Fuma? () não () sim

15.

16. Consome bebidas energéticas? () não

() sim; Qual frequência? _____

17. Pratica atividade física? () não

() sim;

Qual tipo de atividade e frequência? _____

Anexo II. Normas da Revista The Journal of Nutrition, Health & Aging

The Journal of Nutrition, Health & Aging

Instructions for authors

The JNHA is indexed in MEDLINE/Index Medicus, in Current Contents/Clinical Medicine, in Journal Citation Reports/ Science Edition, in Science Citation Index Expanded (Sci Search), in EXCERPTA MEDICA (EMBASE and BIOBASE), in Mental Health Abstracts, Chemical Abstracts (CA), Abstracts in Social Gerontology: Current Literature on Aging, Sociological Abstracts and Social.

Authors are invited to submit their manuscripts on the new submission and review tracking site:
<https://www.editorialmanager.com/jnha/>.

Reviews by the editors and referees will also be performed online, which will greatly facilitate, hasten, and simplify reviews of all manuscripts and potentially reduce publication costs. Authors are encouraged to indicate the names of potential referees as well as those whom they wish not to review the paper, but the editors will make the final choice. The average time interval for the initial review process, if it involves both editorial and peer reviews, is approximately 1 month; occasionally, there are unavoidable delays, usually because of multiple reviews or several revisions on a manuscript. Decisions conveyed may be acceptance with or without revision, non-acceptance with encouragement to make revisions and resubmit, non-acceptance with encouragement to resubmit in another format (e.g., letter to the editor), or rejection. Manuscripts held for revision will be retained for a maximum of 90 days. Authors who plan to resubmit but cannot meet this deadline should contact the editorial office. To maximize the number of pages that can be published and yet maintain high quality, there are strict limits on the total number of a) text words, b) graphics (tables, figures and appendices combined), and c) references. Authors retain the right to use the article for personal professional purposes (teaching, lecturing). The publication of all articles published in the JNHA is compliant with the NIH open access policy (http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/M9551R_NIH_OpenAccess_Flyer.pdf).

ABSTRACT

JNHA requires that abstracts of manuscripts submitted for the Clinical Investigations, Brief Reports, and Brief Methodological Reports sections be in a structured form conforming to guidelines published in the Journal of

the American Medical Association (1998;280:23–24). See also *Annals of Internal Medicine* (1990;113:69–76). Abstracts should include the following headings: Objectives, Design, Setting, Participants, Intervention (if any), Measurements, Results, and Conclusion. Specify the sample size. Emphasize clinical relevance in the abstract's conclusion. Failure to adhere to this format will delay or unduly prolong the review process. Following the abstract conclusion, list 3 to 5 key words to be used for indexing. Editorials, Letters to the Editor and Geriatric Literature do not require an abstract.

KEY WORDS

Authors should include 3 to 5 key words at the end of the abstract for all papers except Editorials, Geriatric Literature, and Letters to the Editor.

ETHICAL STANDARDS

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

EXPERIMENTAL SUBJECTS/ANIMALS

The journal of nutrition, health & aging only publishes articles that are ethically approved. All authors are expected to abide by accepted ethical standards. In investigations that involve human subjects or laboratory animals, authors should provide an explicit statement in Materials and Methods that the experimental protocols were approved by the appropriate institutional review committee and meet the guidelines of their responsible governmental agency. In the case of human subjects, informed consent is essential.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE FORM

All potential benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. All authors must complete the Conflict of Interest Form individually even if an author has no conflict of interest to disclose. If all participating authors declare no conflict of interest, it is still required for each author to include a disclosure statement in the manuscript text.

IMPORTANT: All forms must be completed as

instructed from each author and there must be a disclosure statement included in the manuscript text for each author before the manuscript can be sent out for peer review. Furthermore, the completed forms must be uploaded with the manuscript during the initial submission via the Editorial Manager website.

PERMISSIONS

Use or reproduction of materials from other sources (e.g., journal, book) must be accompanied by a statement or document from both author and publisher giving permission to JNHA for reproduction.

PEER REVIEWING

At submission of your paper please add complete references: email, postal address and phone number for 4 potential reviewers. The Peer Reviewing Process will only start at reception of this list.

ACCEPTED MANUSCRIPTS

Manuscripts accepted for publication should be mailed (preferably by express mail) to the JNHA Editorial office. Please submit one original hard copy with one copy of illustrations (if needed) and an IBM-compatible diskette of the paper. Failure to adhere to these recommendations may delay publication of your manuscript.

PAPER LENGTH

Limit the paper to a maximum of 5 000 text words, 7 graphics (tables, figures, appendices), and 100 references. A structured abstract is required (see under Abstract). However if the article exceeds 2 printed pages of the journal, it will be charged 295 Euros/328 \$ per extra page.

SHORT PAPERS ARE WELCOME

These are clinical-investigation or clinical-experience reports whose findings are somewhat preliminary or a clinical study reporting on narrowly focused or limited findings. Brief Reports are limited to 1 800 text words, 3 graphics (tables, figures, appendices), and 30 references, plus a brief structured abstract limited to one double-spaced manuscript page (see under Abstract).

PERMISSION TO REPRINT

Requests for permission to republish material previously printed in the JNHA in another journal should be directed to Carine Giry. carine.giry@serdi-fr.com

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in brackets.

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8. Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php <http://www.springer.com/journal/12603>